

MIRIAM MACHADO CÚNICO

ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DA
***Ottonia martiana* Miq., PIPERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadores: Dr. Vitor Alberto Kerber

Dr.^a Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA
2001

“Estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae”.

por

Miriam Machado Cúnico

**Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre no Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão
Examinadora**



Prof. Dr. Odulio Gomes Miguel (Orientador/Presidente)



Dr. Celso Garcia Auer



Profª. Drª. Márcia do Rocio Duarte

Curitiba, 26 de outubro de 2001

A Deus, ao meu marido e filhos
pelo constante apoio, amor e paciência.

Ao professor Dr. Obdulio Gomes
Miguel, meus sinceros agradecimentos
pela orientação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, por ter-me recebido em sua ilustre casa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de alguma maneira estiveram envolvidos na minha caminhada.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo convívio.

Ao Botânico Gert Hatschbach, pela identificação da espécie vegetal.

Aos coletores Marília Borgo, Osmar S. Ribas (nº 3633 - MBM) e Valceli A. Pereira (MBM), pela colaboração na coleta do material vegetal.

Aos amigos Álvaro Lenzi, Paulo Martimiano Dias e familiares, por permitirem o acesso ao material vegetal.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, representado pelo Dr. Francisco Carvalho Madruga, Dr. Roberto Tomaz e Djalma Barbosa Neto, pela valiosa contribuição na pesquisa e aquisição dos isolados fitopatogênicos.

Ao laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR, representado pela Profª Wanda N. Abrahão e Geni Peruzzo, pela cooperação na avaliação da atividade antimicrobiana.

À Dra. Marta Regina Tazoniero do Amaral e Dra. Carmem Etsuko Kataoka, da Tecpar, pelo fornecimento das cepas de bactérias com ATCC.

Ao José Macedo e Marinilce Macedo, pela amizade e ajuda prestada através da doação de materiais da Softlab e Sarstedt.

Ao Dr. Franco Delle Monache, pelo auxílio na análise e interpretação dos dados espectrais (RMN de ^1H e ^{13}C).

Ao prof. Aluizio Abreu Marcondes, pela ajuda prestada na interpretação dos dados cromatográficos.

Ao prof. Juarez de Souza Oliveira, pela cooperação na extração e empréstimo do equipamento portátil extrator para operações com gases liquefeitos.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

Em especial:

Aos meus pais, pelo incentivo e dedicação em todos os momentos.

Ao João Luiz de Souza Carvalho, pela amizade e grande contribuição nas análises cromatográficas.

Às amigas Virgínia Cláudia da Silva e Deise Prehs Montrucchio, pelo carinho, incentivo, colaboração e apoio em todas os momentos.

Aos pesquisadores Dr. Celso Garcia Auer e Dr. Albino Grigoletti Júnior da EMBRAPA Florestas, pela contribuição, incentivo, apoio e amizade dispensados durante o período da realização deste trabalho, propiciando um maior aprofundamento nas questões polêmicas desta pesquisa.

À Prof^a. Dra. Marilis Dallarmi Miguel, pelo acompanhamento e revisão do estudo, não medindo esforços na co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber, pela co-orientação dispensada.

NOTA BIBLIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Licenciatura em Ciências, habilitação em Química e em Bacharelado em Química pela Universidade Católica do Paraná em 1984. Em seguida, atuou como professora de química em vários colégios particulares, sendo atualmente professora efetiva da SEED-PR.

No decorrer deste período, especializou-se em Metodologia da Ciência com Habilitação ao Magistério Superior pela Faculdade de Ciências Humanas e Sociais de Curitiba (1995) e em Farmacologia pela Universidade Federal do Paraná (1997).

Em 2000 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, onde desenvolveu um estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, cujos resultados estão contidos neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO GERAL.....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA.....	6
2.1.1. DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA PIPERACEAE.....	6
2.1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA PIPERACEAE	8
2.1.3. ANATOMIA DA FAMÍLIA PIPERACEAE.....	9
2.1.3.1. SEGUNDO CRONQUIST E ENGLER.....	9
2.1.3.2. SEGUNDO METCALFE E CHALK.....	9
2.1.4. ASPECTOS FITOQUÍMICOS DA FAMÍLIA PIPERACEAE.....	11
2.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO E A ESPÉCIE.....	12
2.2.1. SINONÍMIA DA ESPÉCIE	12
2.2.1.1. SINONÍMIA VULGAR.....	12
2.2.1.2. SINONÍMIA CIENTÍFICA.....	12
2.2.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE.....	13
2.2.3. ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE.....	13
2.2.4. MORFOLOGIA DA ESPÉCIE.....	14
2.2.5. OBSERVAÇÕES ECOLÓGICAS DA ESPÉCIE.....	16
2.2.6. ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS DA ESPÉCIE.....	16
2.2.7. ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE VÁRIAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ottonia</i>	17
2.2.8. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	21
3.2. ESTABILIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO.....	21
3.3. MÉTODO DE ISOLAMENTO E SEPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS (MIGUEL)..	21
3.3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO	21
3.3.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO	22
3.3.3. PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS PELO FRACIONAMENTO	24
3.3.4. SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FD POR CC.....	27
3.3.4.1. PREPARO DA PASTILHA.....	27

3.3.4.2. PROCEDIMENTO.....	27
3.4. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FD.....	29
3.5. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS PELO EXTRATOR (EQUIPAMENTO PORTÁTIL PARA OPERAÇÕES COM GASES LIQÜEFEITOS).....	29
3.5.1. DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL EMPREGADO PELA EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	29
3.5.2. OPERAÇÃO DO EXTRATOR.....	32
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	33
3.6.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS.....	33
3.6.2. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	34
3.6.3. PREPARO DOS DISCOS DE PAPEL.....	34
3.6.4. PREPARO DO MEIO DE CULTURA.....	34
3.6.5. PREPARO DO INÓCULO.....	35
3.6.6. TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	36
3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	36
3.7.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO AQUOSO.....	36
3.7.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS EBEtOH E SECOS	37
3.7.3. CRESCIMENTO MICELIAL.....	37
3.7.4. TESTE DE ANTAGONISMO.....	38
3.7.5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	39
3.7.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS TOTAIS.....	40
4.2. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO.....	41
4.3. SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FD OBTIDA POR PARTIÇÃO S/L.....	41
4.4. IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	43
4.4.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO OMA 1	43
4.4.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO OMA 3	51
4.5. IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE <i>O. martiana</i> OBTIDOS PELO EQUIPAMENTO PORTÁTIL EXTRATOR PARA OPERAÇÕES COM GASES LIQUEFEITOS	59
4.5.1 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS EXTRATOS ANALISADOS..	59
4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DA <i>O. martiana</i>	67
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA DOS EXTRATOS DA <i>O. martiana</i>	69
5. CONCLUSÃO	77
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	<i>Ottonia martiana</i>	5
FIGURA 2 -	ALGUNS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA FAMÍLIA PIPERACEAE.....	7
FIGURA 3 -	MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA	8
FIGURA 4 -	ANATOMIA DE PIPERACEAE.....	10
FIGURA 5A -	MORFOLOGIA DA <i>O. martiana</i>	14
FIGURA 5B -	ALGUNS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA <i>O. martiana</i>	15
FIGURA 6	ESTRUTURA QUÍMICA DO 1-BUTIL-3,4 METILENODIOXIBENZENO	18
FIGURA 7 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA ISOBUTILAMIDA: ÁCIDO P-METOXICINAMAL PIRÚVICO	18
FIGURA 8 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA AMIDA: (2E, 4E)-N-ISOBUTIL-9-PIPERONIL- NONA-2,4-DIENAMIDA.....	18
FIGURA 9 -	ESTRUTURA QUÍMICA (Amidas: Piperlonguminina, isopiperlonguminina, Corcovadina, Isocorcovadina e Piperovatina	19
FIGURA 10 -	ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO (L/L).....	23
FIGURA 11 -	ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO (S/L).....	26
FIGURA 12 -	ESQUEMA DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL EXTRATOR PARA OPERAÇÕES COM GASES LIQUEFEITOS.....	30
FIGURA 13 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA OMA 1	43
FIGURA 14A-	ESPECTRO DE ¹ H RNM - OMA 1	45
FIGURA 14B-	ESPECTRO DE ¹ H RNM - OMA 1	46
FIGURA 15A-	ESPECTRO DE ¹³ C RNM - OMA 1	48
FIGURA 15B-	ESPECTRO DE ¹³ C RNM - OMA 1	49
FIGURA 16 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA OMA 3	51
FIGURA 17A-	ESPECTRO DE ¹ H RNM - OMA 3	53
FIGURA 17B-	ESPECTRO DE ¹ H RNM - OMA 3	54
FIGURA 18A-	ESPECTRO DE ¹³ C RNM - OMA 3	56
FIGURA 18B-	ESPECTRO DE ¹³ C RNM - OMA 3	57
FIGURA 19 -	CROMATOGRAMAS (CG) DOS PADRÕES	60
FIGURA 20 -	CROMATOGRAMAS (CG): E1, E3 E PADRÕES	61
FIGURA 21 -	CROMATOGRAMAS (CG): E1, E1 + PADRÕES	62
FIGURA 22 -	DADOS DA ANÁLISE POR CG-MS DO EXTRATO E1.....	63
FIGURA 23 -	ESPECTROS DE MASSA	64
FIGURA 24 -	CROMATOGRAMAS (CG) DO E5.....	65
FIGURA 25 -	DADOS DA ANÁLISE DO EXTRATO E5 POR CG-MS.....	66
FIGURA 26 -	ESPECTRO DE SENSIBILIDADE DO ISOLADO <i>S. aureus</i>	68

FIGURA 27	FOTOGRAFIAS DAS COLÔNIAS DOS PATÓGENOS TESTADOS	71
FIGURA 28	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	72
FIGURA 29A	PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPLC) DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS DAS FOLHAS SEÇÃO NÃO AUTOCLAVADOS E AUTOCLAVADOS	74
FIGURA 29B	PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPLC) DOS PADRÕES E AMOSTRAS MAIS PADRÕES	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>O. martiana</i>	13
TABELA 2 -	CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	35
TABELA 3 -	CONCENTRAÇÃO E pH DOS EXTRATOS BRUTOS TOTAIS.....	40
TABELA 4 -	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO S/L	41
TABELA 5 -	RESULTADO DA SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO S/L	42
TABELA 6	DADOS DE ^{13}C RMN E ^1H RMN DO COMPOSTO ISOLADO OMA1	50
TABELA 7	DADOS DE ^{13}C RMN E ^1H RMN DO COMPOSTO ISOLADO OMA 3	58
TABELA 8 -	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DA <i>O. martiana</i>	59
TABELA 9	RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	67
TABELA 10	ATIVIDADE FUNGITÓXICA DOS EBEtOH E AQUOSOS.....	69
TABELA 11	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E AQUOSOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DOS PATÓGENOS TESTADOS.....	70
TABELA 12	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS FUNGOS NAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento Químico
μL	Microlitro
(m/m)	Massa por Massa
(m/v)	Massa por Volume
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
^{13}C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear Protônica
3x	Três Vezes
ACN	Acetonitrila
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Massa
d	Dubleto
dd	Duplo Dubleto
E_1	Extrato de Frutos de <i>O. martiana</i> : 1 ^a Extração Realizada no Equipamento Portátil Extrator
E_2	Extrato de Frutos de <i>O. martiana</i> : 2 ^a Extração Realizada no Equipamento Portátil Extrator
E_3	Extrato de Frutos de <i>O. martiana</i> : 3 ^a Extração Realizada no Equipamento Portátil Extrator
E_4	Extrato de Frutos de <i>O. martiana</i> : 4 ^a Extração Realizada no Equipamento Portátil Extrator
E_5	Extrato de Frutos de <i>O. martiana</i> : 5 ^a Extração Realizada no Equipamento Portátil Extrator
EB	Extrato Bruto
EBAQUOSO .	Extrato Bruto Aquoso
EBEtOH	Extrato Etanólico
EBT	Extrato Bruto Total
Fc	Frasco Coletor
FD	Fração Diclorometano

GLP.....	Gás Liquefeito do Petróleo
h	Hora
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
H _A	Hidrogênio do C ₂ da <i>OMA 1</i> e <i>OMA 2</i>
H _B	Hidrogênio do C ₃ da <i>OMA 1</i> e <i>OMA 2</i>
H _C	Hidrogênio do C ₄ da <i>OMA 1</i> e <i>OMA 2</i>
H _D	Hidrogênio do C ₅ da <i>OMA 1</i> e <i>OMA 2</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
J	Constante de Acoplamento
L/L	Líquido/ Líquido
m	Multipeto
MBM	Museu Botânico Municipal
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
OMA 1	Substância 1 Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMA 2	Substância 2 Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMA 3	Substância 3 Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMA 4	Substância 4 Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMA 5A	Substância 5A Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMA 5B	Substância 5B Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMA 6	Substância 6 Isolada da <i>Ottonia martiana</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P' e P".....	Pino das Válvulas
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
s	Singleto
t	Tripleto
TMS.....	Tetrametil Silano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
v/v	Volume / Volume

RESUMO

A *Ottonia martiana* Miq., arbusto da família Piperaceae, é conhecida na medicina popular brasileira como "Anestésica". Partes desta planta são utilizadas em alcoolaturas para aliviar dor de dente, devido à sua ação anestésica sobre a mucosa bucal. Estudo fitoquímico realizado com extrato das raízes desta planta indicou a presença de duas isobutilamidas: Isopiperlonguminina e Piperovatina, as quais foram identificadas por Espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Análises por CG-MS nos extratos dos frutos desta espécie em estudo revelaram a presença de dois isômeros, um do composto estigmasterol e outro do β -sitosterol. No estudo das atividades antimicrobianas, extratos brutos etanólicos das raízes e caules (50 e 100%) desta planta apresentaram efeito antibacteriano sobre *S. aureus*, quando testados pelo método por difusão em gel. Também, foi verificado que extratos desta espécie apresentaram atividade antifúngica (crescimento micelial) sobre *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Rhizoctonia* sp., dependente da concentração, do método de extração e do órgão utilizado. Os resultados confirmaram a presença de princípios ativos, os quais poderão vir a ser empregados na terapêutica, inclusive com potencial para controle de microrganismos fitopatogênicos.

ABSTRACT

Ottonia martiana Miq., a shrub from the family Piperaceae, is known in Brazilian folk medicine as "Anestésica". Its parts are used in alcoholic macerates to relieve toothache, due to its anesthetic action on mucous membrane. Phytochemical investigation performed with extract of *O. martiana* roots indicated the presence of two isobutylamides: Isopiperlonguminine and Piperovatine, which were identified by spectroscopy NMR (^1H and ^{13}C). In analysis of the extracts of fruits by GC-MS, isomers of stigmasterol and β -sitosterol are present. In the studies of antimicrobial activity, ethanolic crude extracts of the roots and stems (50 and 100%) from this plant showed antibacterial effects against *S. aureus*, by paper disk-diffusion method. Also, it was observed that extracts of this species exhibit antifungal activity (mycelial growth) against *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* and *Rhizoctonia* sp, dependent on the extract concentration, extraction method and employed organ. The results confirmed the presence of active substances, which could be employed in therapeutics, and with potential to control phytopathogenic microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

Desde a antigüidade as plantas têm sido um recurso ao alcance do homem, o qual, com o passar dos anos, aprofundou seus conhecimentos empiricamente na busca de soluções para as suas necessidades básicas: alimentação, saúde, habitação, proteção, entre outras.

As propriedades curativas das plantas foram descobertas, a princípio, intuitivamente ou pela observação do comportamento dos animais que na doença, buscavam nas plantas a cura para suas afecções.

"Nesta perspectiva da pesquisa natural, o homem encontrou nas chamadas plantas medicinais, virtudes, cujo valor tornou-se reconhecido e por tantas vezes, considerado como mágico e até alquimista, sendo transmitido de geração à geração." (MIGUEL e MIGUEL, 1999, p. 11)

Entretanto, nos diversos estágios de desenvolvimento da sociedade, a importância dada às plantas assumiu altos e baixos, conforme a intensidade do seu uso.

Atualmente, o reino vegetal é considerado um poderoso laboratório de síntese de moléculas orgânicas e como diversas moléculas com estruturas complexas dependem unicamente de síntese biológica, ou pela inviabilidade econômica ou pela impossibilidade de ser realizada em laboratório, as plantas medicinais passaram a ser objeto de grande interesse, não só pelos cientistas, mas também pela população, que por si mesma tenta resgatar o legado cultural de que faz parte.

Logo, as plantas são utilizadas no mundo como matéria-prima na forma de extratos, óleos essenciais e substâncias químicas puras e semi-sintéticas (JORQUEIRA, 1993, p. 2).

Neste contexto, MIGUEL e MIGUEL (1999, p. 15) afirmam que "a busca e intensificação do uso de plantas *in natura* pela população, para fins medicinais, ocorre até mesmo nas sociedades mais industrializadas."

Todavia, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da humanidade não possui acesso ao atendimento primário de saúde, por encontrar-se longe dos centros de saúde, ou pela carência financeira que permita tal atendimento (GOTTLIEB; KAPLAN, 1993, p. 51-54).

Dessa forma, passa a ser inegável o fato de que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais como único lenitivo para seus males, a qual, incentivada pelos meios de comunicação, torna-se vítima de oportunistas.

No Brasil, o estímulo ao uso de plantas medicinais perpassa as questões culturais, além daquelas oriundas do livre comércio de Fitoterápicos. O mito de que “o que é natural não faz mal” leva a sociedade à substituir por conta própria o atendimento médico, e conseqüentemente, a terapêutica adequada. A utilização inadequada de medicamentos quimicamente potentes, tóxicos e/ou inadequados, oportunizam riscos de intoxicação, contaminação microbiológica e agravamento dos estados patológicos.

Por outro lado, as plantas medicinais também têm sido vistas como fontes de substâncias fungitóxicas e antibacterianas, as quais, quando comparadas com os derivados sintéticos, mostram-se praticamente inofensivas para o meio ambiente, podendo, em alguns casos, até superá-los em sua ação (STANGARLIN et al., 1999, p. 16-21).

Outro aspecto importante a ser considerado refere-se ao potencial químico da flora brasileira. Segundo SCHWARTSMAN (1994, p. 126-131) e GUEDES (1997, p. 1), 30% das florestas tropicais existentes no mundo, pertencem ao nosso País.

Porém, apesar da flora brasileira ser considerada uma das floras mais ricas do mundo, o Brasil tornou-se um grande importador de matérias-primas vegetais (BRAZ FILHO, 1994, p. 405-420).

Sem dúvida, todas estas questões associadas à grande difusão do uso de espécies de Piperaceae (família das Pimenteiras), por meio de crenças e tradições seculares (LOPES, 1989, p. 1), despertaram nos pesquisadores um grande interesse em realizar investigações científicas nesta área de produtos naturais.

Neste contexto, uma das espécies desta família, a *Ottonia martiana* Miq., desperta a atenção da pesquisa fitoterápica.

Pelo exposto, a realização do estudo fitoquímico e das atividades biológicas desta planta poderá representar um importante fator em favor da autonomia nacional no desenvolvimento de tecnologias de ponta na produção de fármacos, além da

aquisição de maiores conhecimentos que reforcem a possível utilização de extratos brutos vegetais, como um método alternativo de controle de doenças de plantas.

Portanto, a necessidade de medicamentos mais acessíveis para a população e a busca de novas medidas de controle alternativo de doenças de plantas serviram de estímulo inicial para desenvolver o trabalho de investigação aqui proposto com a *O. martiana*, a qual, segundo LOPES (1989, p. 2), é uma planta comum do litoral dos Estados do Paraná e Santa Catarina, e empregada popularmente nas odontalgias, promovendo alívio imediato da dor e por isso denominada de “Anestésica”.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *O. martiana* Miq., Piperaceae.

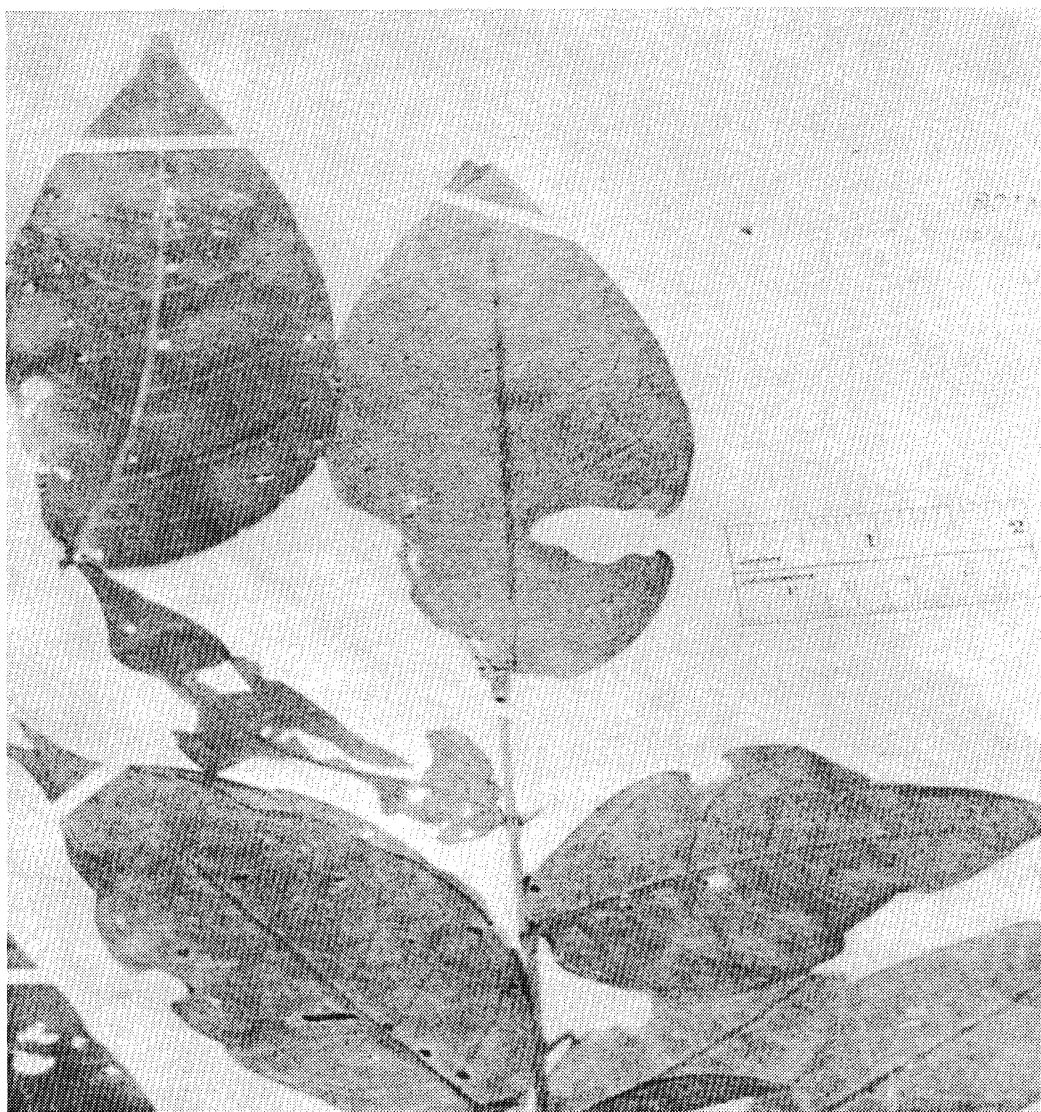
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar constituintes químicos presentes no extrato da espécie em estudo, *O. martiana*, através da otimização de técnicas já existentes.
- Identificar os compostos isolados.
- Verificar se os extratos brutos etanólicos desta espécie apresentam atividade antibacteriana.
- Verificar se os extratos brutos aquosos e etanólicos desta espécie apresentam atividade antifúngica contra fitopatógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a realização deste trabalho, um levantamento bibliográfico da espécie *O. martiana* Miq., Piperaceae (fig. 1), arbusto ramoso comum do litoral dos Estados do Paraná e Santa Catarina, foi realizado no Chemical Abstract, Biological abstract, Cab Abstract, Medline, International Pharmaceuticals Abstracts, entre outros.

FIGURA 1 - *O. martiana* Miq., Piperaceae



FONTE: HOEHNEA (1973, p. 270)

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA Piperaceae

A família Piperaceae, considerada uma das mais numerosas das Dicotiledôneas por GUIMARÃES, ICHASO e COSTA (1978, p. 3), é constituída de 10 gêneros e um grande e incerto número de espécies, estimadas entre 1400 e 2000, pertencendo a grande maioria, a somente dois gêneros: *Piper* e *Peperomia*, segundo CRONQUIST (1981, p. 88) e JOLY (1998, p. 308).

Entretanto, BARROSO et al. (1978, p. 45) afirmam que esta família apresenta cerca de 10-12 gêneros e 1400 espécies com distribuição tropical, sendo cinco gêneros e 460 espécies nativas do Brasil.

De acordo com ATAL, DHAR e SINCH (1975, p. 257-265), o nome genérico *Piper* provavelmente derivou do sanscrito, referindo-se ao sabor picante e ao aroma das sementes de *Piper nigrum* L.

CRONQUIST (1981, p. 88) relata que o gênero *Piper* tem sido objeto de excessiva e injustificada multiplicação dos nomes das espécies desta família, dificultando desta forma, a real quantificação destas espécies.

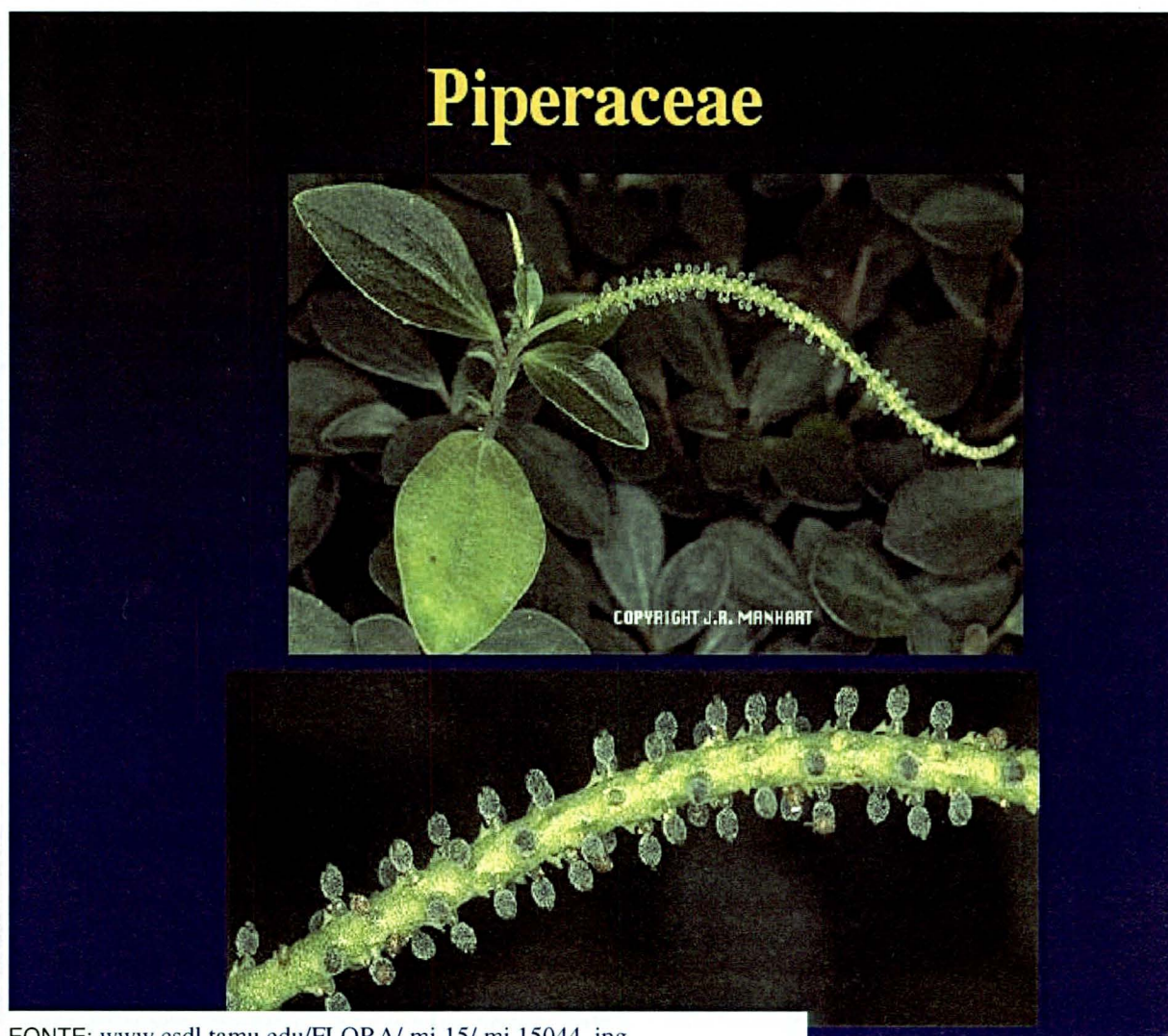
2.1.1 Descrição da família Piperaceae

Segundo GUIMARÃES, ICHASO e COSTA (1978, p. 3), são ervas eretas ou escandentes, arbustos ou arboretas, terrestres ou epífitas. Folhas alternas, opostas ou verticiladas, inteiras, sésseis ou pecioladas de consistência e formatos os mais diversos, bem como de indumento muito variado, geralmente dotadas de glândulas translúcidas, glabras ou pilosas, palmadas ou peninervadas; estípulas ausentes ou adonadas ao pecíolo. As flores são aclamídeas, pequenas, esparsas ou congestas, andróginas ou unissexuais, protegidas por bractéolas pediceladas, sacado-galeadas ou peltadas ou sésseis, com peltas de diferentes formatos, dispostas em espigas umbeladas (*Photomorphe*) ou não (*Piper*, *Peperomia*, *Sarcorrhachis*), ou ráculos (*Ottonia*), dispostas axilarmente às folhas (*Sarcorrhachis*) ou opostas às mesmas, terminais ou laterais, pedunculadas.

Estames nas espécies brasileiras, 2-6 livres ou aderentes às paredes do ovário. Anteras rimosas, bitecas ou unitecas. Ovário súpero, séssil (*Peperomia*, *Piper*, *Sarcorrhachis* e *Photomorphe*), geralmente imerso na raque, ou pedicelado (*Peperomia*, *Ottonia*), unicelular, uniovulado, com estigmas de 1-5 de forma variada, estiloso ou não. Óvulo basal, ortrótopo. Drupas sésseis ou pediciladas, podendo ser os pedicelos verdadeiros ou falsos. Endosperma escasso, apresentando perisperma. Embrião mínimo. Segundo CRONQUIST (1981, p. 88), esta família apresenta caule comumente nodoso, feixe vascular marginal, às vezes dispersos como nas monocotiledôneas

Na figura 2 deste trabalho, encontram-se inseridos alguns aspectos morfológicos desta família.

FIGURA 2 - ALGUNS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA FAMÍLIA PIPERACEAE



FONTE: [www.csdl.tamu.edu/FLORA/ mi 15/ mi 15044. jpg](http://www.csdl.tamu.edu/FLORA/mi_15/mi_15044.jpg)

2.1.3 Anatomia da Família Piperaceae (fig. 4)

2.1.3.1 Segundo CRONQUIST (1981) e ENGLER (1964)

Apresentam células esféricas no tecido parenquimatosos, contendo óleo essencial. Em algumas células do parênquima estão presentes cristais de oxalato de cálcio, solitários ou agrupados. Arranjo disperso dos feixes vasculares (eixo), como o das monocotiledôneas.

2.1.3.2 Segundo METCALFE e CHALK (1950, p. 1120-1127)

Elementos secretores são também representados por canais de mucilagem na região do tecido (parênquima fundamental) em certas espécies de *Piper*. Estômatos quase sempre confinados à superfície inferior (folha) são freqüentemente rodeados por uma roseta de numerosas células epidérmicas, enquanto que outros são crucíferos. Hipoderme é geralmente diferenciada, e não raramente consiste de um considerável número de camadas de células (figs. 4A-B). Cristais, na maioria das vezes, na forma de pequenas agulhas (fig. 4A). Hidatódios encontrados geralmente em ambas as superfícies das folhas das espécies havaianas de *Peperomia* (fig. 4C-D).

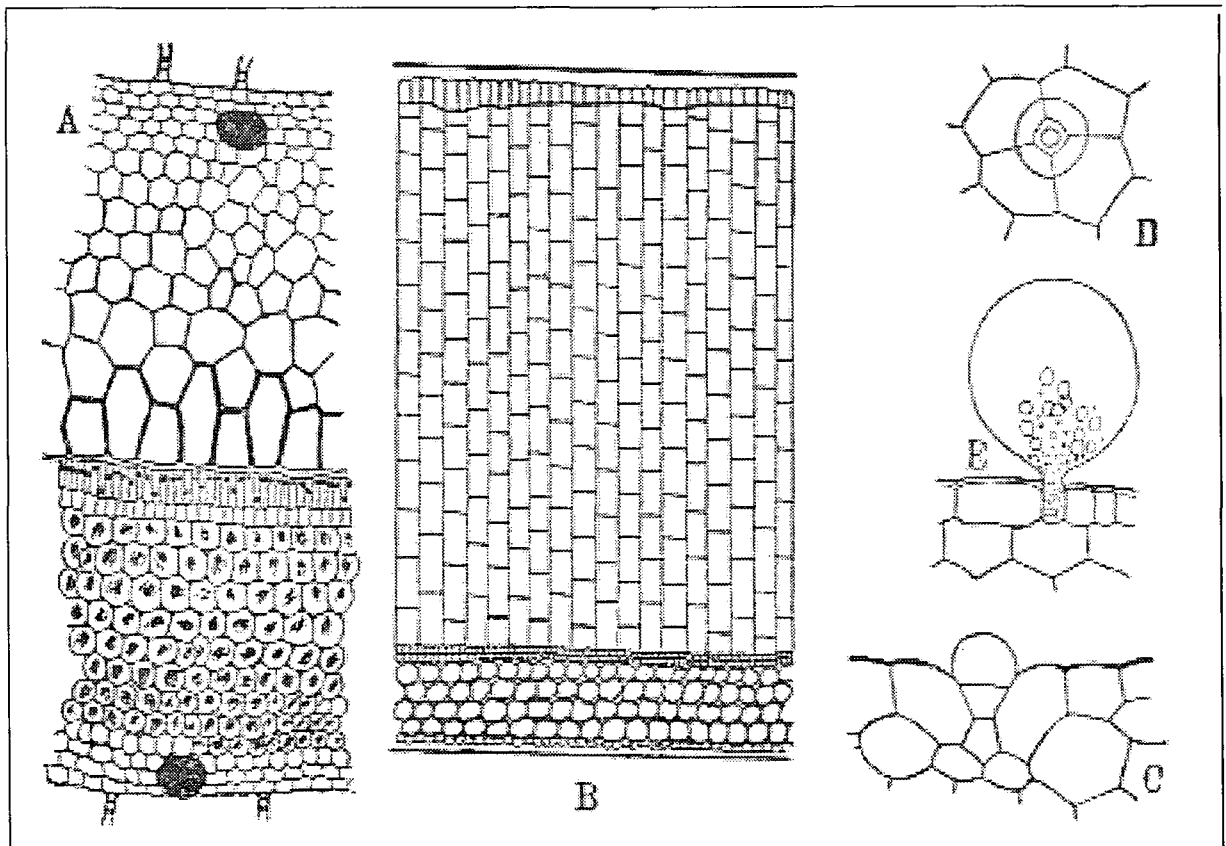
FIGURA 4 – ANATOMIA DE Piperaceae

A: Secção transversal da folha de *Peperomia incana* Dietr.

B: Secção transversal da folha de *P. pereskiaefolia* H. B. et K.

C-D: Hidatódios de *P. incana*.

E: Glândula excretora de *Piper* sp.



FONTE: METCALFE e CHALK (1950, p. 1122)

2.1.4 Aspectos Fitoquímicos da Família Piperaceae

Estudos com extratos de plantas da família Piperaceae revelaram a presença de uma grande diversidade de metabólitos secundários com marcantes atividades biológicas. Dentre estes, lignanas, neolignanas, terpenos, chalconas, flavonas, fenilpropanóides, alcalóides e amidas podem ser citados.

De acordo com SENGUPTA e RAY (1987, p. 147-166), os alcalóides, kavalactonas e as amidas são isolados freqüentemente de espécies de Piperaceae, sendo as amidas metabólitos característicos de Piperaceae, as quais são classificadas em isobutílicas, pirrolidínicas, piridônicas e piperidínicas.

2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO E A ESPÉCIE

YUNCKER (1973, p. 121-123) realizou um estudo de 23 espécies de *Ottonia*, fornecendo a chave analítica para a sua identificação. Neste estudo ele afirmou que as diferenças, nas quais a maioria das espécies estão baseadas, não são notáveis, e que o gênero *Ottonia* representa um desenvolvimento evolucionário recente de *Piper*, quando comparado ao *Piper*.

2.2.1 Sinonímia da Espécie

2.2.1.1 Sinonímia vulgar

- Segundo GUIMARÃES, ICHASO e COSTA (1981, p. 14):
Jaborandi, Taburutá, Jaguarandi (SC)
- Segundo LOPES (1989, p. 2):
Anestésica (nativos do litoral do PR)

2.2.1.2 Sinonímia científica

- Segundo YUNCKER (1973, p. 136):

" *Piper miquelianum* C.DC. in DC., Prodr. **16** (1):254. 1869; *Ottonia apodostachya* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:697. 1935; *Ottonia apodostachya* var. *vidalii* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:697. 1935; *Ottonia dusei* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:702. 1935; *Ottonia dusei* var. *heterophylla* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:702. 1935; *Ottonia dusei* var. *variifolia* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:702. 1935; *Ottonia elocalis* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:703. 1935; *Ottonia hammari* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:705. 1935; *Ottonia hoehnei* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:705. 1935; *Ottonia loefgreni* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:707. 1935; *Ottonia muelleri* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:710. 1935; ? *Ottonia miguelitensis* var. *parcepilosa* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:710. 1935; *Ottonia riofeioana* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:713. 1935; *Ottonia schwackeae* Trel., Proc. Am. Philos. Soc. **75**:714. 1935."

2.2.2 Distribuição Geográfica da Espécie

Segundo YUNCKER (1973, p. 137), a *O. martiana* está distribuída nas regiões sul e sudoeste brasileira.

No Paraná pode ser encontrada em:

- Antonina, Guaratuba, Município de Paranaguá, Serra da Preta, Pinhais, Caiobá, Morro do Caieba, Jaguariaíva, Adrianópolis, Paranaíba, entre outros.

2.2.3 Enquadramento Taxonômico da Espécie

O enquadramento taxonômico da *O. martiana*, segundo ENGLER (1964) e CRONQUIST (1981), encontra-se inserido na tabela 1 abaixo:

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA *O. martiana*

	Segundo ENGLER (1964):	Segundo CRONQUIST (1981):
Divisão:	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe:	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse:	Archichlamydeae	Magnoliidae
Ordem:	Piperales	Piperales
Família:	Piperaceae	Piperaceae (Peperomiaceae)
Gênero	<i>Ottonia</i>	<i>Ottonia</i>
Espécie	<i>Ottonia martiana</i>	<i>Ottonia martiana</i>

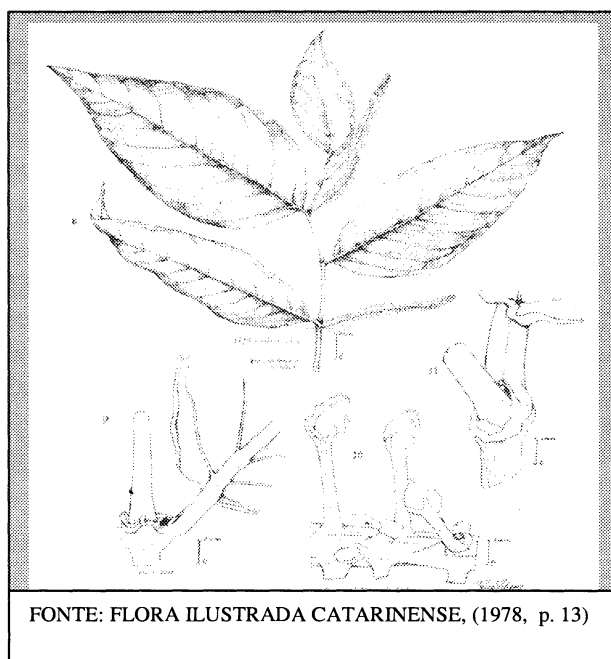
2.2.4 Morfologia da Espécie (figs. 5A e 5B)

Segundo GUIMARÃES, ICHASO e COSTA (1978, p. 12-15), a *O. martiana* é um arbusto ramoso, acima de 2 m de altura, ramos estriados, glabros, entrenós distando em 4-9 cm. Suas folhas são curto-pecioladas, 1-1,5 cm de comprimento. Lâmina elíptico-ovada, com 10-16 cm de comprimento e 5-9 cm de largura, assimétrica, base arredondada ou subarredondada, levemente assimétricocordada, acuminada no ápice, glabrescente ou pubescente na nervura média dorsal e glabra na ventral, com nervuras impressas nesta face. As nervuras secundárias, em número de 10, são alternas e ascendentes em relação à principal, nervuras terciárias axiais e laterais, anastomose de nervuras de ordem inferior paralelamente ao bordo.

As espigas são de 8-11 cm de comprimento com pedúnculo piloso, variando, em diâmetro de 5-10 mm, na floração e 12-15 mm, na frutificação. Raque sulcada, de pubérula a glabrescente. Bractéolas sacado-galeadas, curto pediceladas.

As flores com pedicelos piloso-papilosos ou glabrescentes, com 2 mm de comprimento, ultrapassando o comprimento do ovário. Estames com filetes curtos, inseridos na base do ovário. Ovário papiloso, ovado-tetragonal. Os estigmas: 4, robustos. As drupas são oblongo-ovóides, tetragonais, 3-4 mm de comprimento, atenuadas no ápice.

FIGURA 5A - MORFOLOGIA DA *O. martiana*



FONTE: FLORA ILUSTRADA CATARINENSE, (1978, p. 13)

FIGURA 5B - ALGUNS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA *O. martiana*



FONTE: FOTOGRAFIA "in natura" DA *O. martiana* (EDIMAR CUNICO, 2001)

2.2.5 Observações Ecológicas da Espécie

A *O. martiana* é encontrada florescendo nos meses de março, outubro, novembro e dezembro, sendo um arbusto de apenas 1 a 2 metros de altura, característico da mata pluvial da encosta atlântica no Estado de Santa Catarina, apresentando vasta e muita expressiva dispersão por quase toda a zona da mata Atlântica, penetrando no Rio Grande do Sul, através da “Porta de Torres”. É uma espécie ciófito e seletiva higrófito; ocorre principalmente nas planícies aluviais, nos inícios das encostas, bem como em solos de alicive pouco acentuado (GUIMARÃES; ICHASO; COSTA, 1978, p. 14).

2.2.6 Aspectos Etnobotânicos da Espécie

Os nomes populares das plantas variam muito de um lugar para outro e é comum designar-se plantas diferentes com um mesmo nome, bem como uma mesma planta por diversos nomes. Segundo OLIVEIRA e AKISUE (1991, p. 27), por Jaborandi, nome oficial da nossa farmacopéia para as espécies *Pilocarpus jaborandi* Holmes, *Pilocarpus microphyllus* Stapf. e *Pilocarpus pennatifolius* Lem., se conhecem diversas espécies pertencentes ao gênero *Piper* e ao gênero *Ottonia* da família Piperaceae.

A *O. martiana* é utilizada pela população nas odontalgias, na forma de alcoolatura (bochechos), ou pela mastigação de fragmentos da planta, promovendo alívio imediato da sensação de dor. Por este motivo foi denominada de “Anestésica” (LOPES, 1989, p. 1-2).

Dentre as várias espécies de *Ottonia*, a *Ottonia propinqua* (KUZE RATES; CHAVES; VON POSER, 1997, p. 113-116), *Ottonia frutescens* (MAKAPUGAY et al., 1983, p. 235-238) e *Ottonia anisum* (GIESBRECHT et al., 1981, p. 375-377) recebem a mesma indicação popular dada à *O. martiana*, ou seja, indicação para o tratamento de odontalgias.

De acordo com LOPES (1989, p. 8-10), várias espécies do gênero *Ottonia* são utilizadas na terapêutica popular. Dentre elas são citadas a espécie:

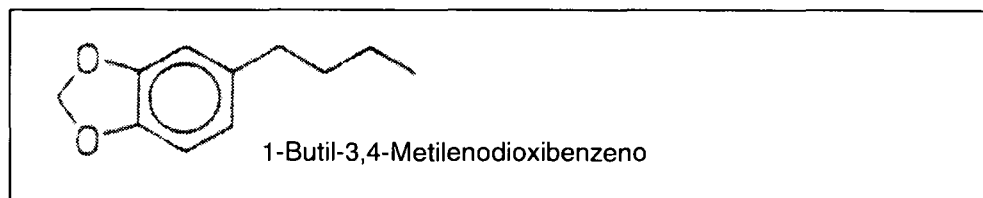
- *Ottonia anisum* Sprengel – Nome popular: Falso Jaborandi. Comum da região central do Brasil. As raízes são diuréticas, diaforéticas, sialagogas, afrodisíacas. A tintura é empregada como estimulante em fricções nas paralisias e reumatismos, e no tratamento de odontalgias.
- *Ottonia carpunga* Miq. - Popularmente conhecida como Alfavaca Carpunha. Natural da Bahia. A raiz é excitante, aromática, sendo também utilizada contra mordidas de cobras.
- *Ottonia eucalyptophyllum* Kunth – Natural do Rio de Janeiro e São Paulo, sendo popularmente conhecida como Nhandu-mirim. A raiz é considerada um diurético energético e anti-blenorrágica.
- *Ottonia propinqua* Kunth – Xery-caá, Jaguarandi e Jaborandi são os seus nomes populares. Natural do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. A raiz com aroma ativo, provoca anestesia e salivação. Era utilizada pelos selvagens como antídoto de intoxicação por cogumelos.
- *Ottonia vahlii* Kunth – Também conhecida como *Piper ovatum* Vahl, é usada em Trinidad, como medicamento contra mordida de cobra e para cura de hidrofobia em animais, sendo assim um depressor nervoso, veneno cardíaco e anestésico local. É natural da Índia Ocidental.
- *Ottonia warakabacoura* Miq. – Conhecida como Nhambi. Natural do Amazonas e Guianas. É recomendada para o tratamento de moléstias do aparelho urinário, como substância estimulante e sialagogas.

2.2.7 Aspectos Fitoquímicos de Várias Espécies do Gênero *Ottonia*

DUSTAN e GARNETT (1895, p. 94-103) isolaram da *Ottonia vahlii* (usada como planta medicinal em Trinidad por provocar formigamento na língua e lábios) um óleo essencial com características compatíveis a sesquiterpenos e um componente não volátil denominado de Piperovatina. Os constituintes químicos deste óleo essencial foram reinvestigados por PINDER e PRICE (1967, p. 2598-

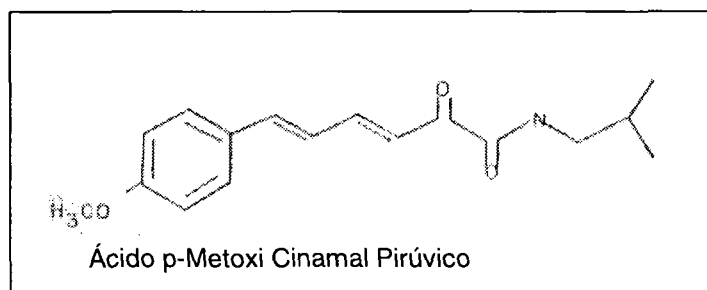
2599), os quais elucidaram a estrutura molecular de um composto ($C_{11}H_{14}O_2$) denominado 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (fig.6).

FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 1-BUTIL-3,4-METILENODIOXIBENZENO



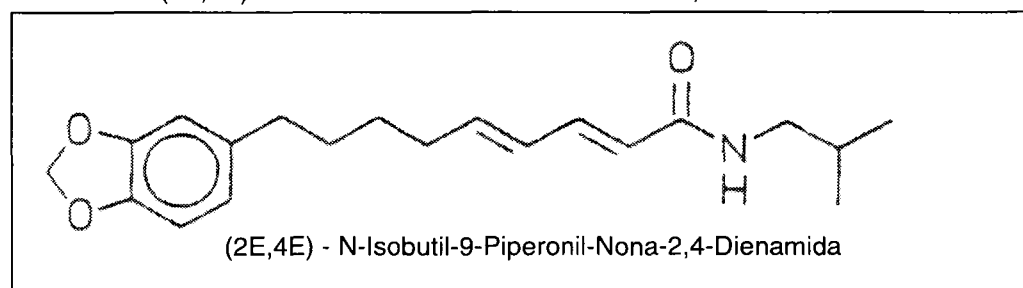
Da mesma espécie botânica avaliada por PINDER e PRICE (partes aéreas), HÄNSEL, LEUSCHKE e BOHLMANN (1980, p. 161-163) isolaram a Piperovatina e uma nova isobutilamida ($C_{17}H_{21}NO_3$): ácido p-metoxi cinamal pirúvico (fig. 7).

FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ISOBUTILAMIDA:
ÁCIDO P-METOXI CINAMAL PIRÚVICO



Das raízes e caules de *Ottonia anisum*, GIESBRECHT et al. (1981, p. 375-377) isolaram a Piperovatina, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno e a desconhecida amida: (2E, 4E) N-isobutil-9-piperonil-nona-2,4-dienamida, $C_{20}H_{26}NO_3$ (fig. 8).

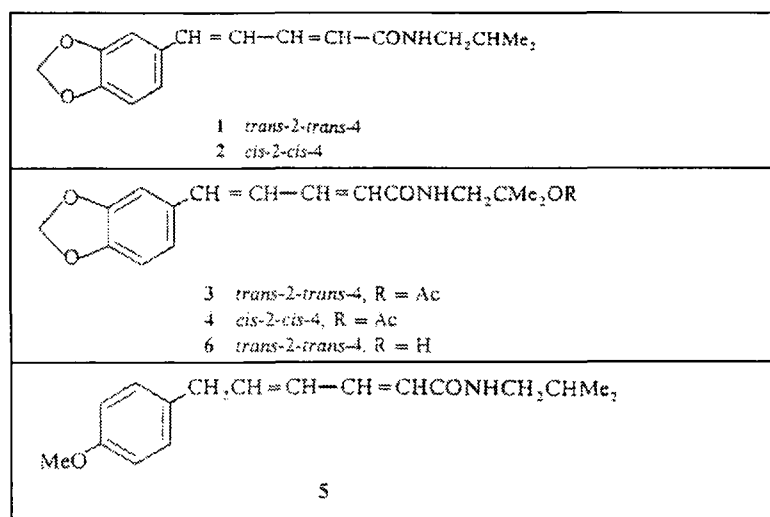
FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DA AMIDA:
(2E,4E)-N-ISOBUTIL-9-PIPERONIL-NONA-2,4-DIENAMIDA



COSTA e MORS (1981, p. 1305-1307) isolaram 5 amidas das raízes de *Ottonia corcovadensis*, sendo duas conhecidas (Piperovatina e Piperlonguminina) e outras três novas, denominadas de Isopiperlonguminina, Corcovadina e Isocorcovadina (fig. 9).

FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS AMIDAS:

1. PIPERLONGUMININA
2. ISOPIPERLONGUMININA
3. CORCOVADINA
4. ISOCORCOVADINA
5. PIPEROVATINA
6. ÁCIDO PIPÉRICO N-(2-HIDROXI-ISOBUTIL)-AMIDA



MAKAPUGAY et al. (1983, p. 235-238) isolaram das raízes e caules de *Ottonia frutescens* a Piperovatina, o princípio ativo de dormência da língua.

LOPES (1989, p. 96-98) isolou de extratos da *O. martiana* (partes aéreas) duas Isobutilamidas (Piperovatina e a Piperlonguminina), além de Nitrato de Potássio.

Do óleo essencial das folhas de *Ottonia anisum* (coletadas no Brasil), MOREIRA, KAPLAN e GUIMARÃES (1997, p. 565-568) isolaram como o principal componente 1-butil-3,4-metilenodióxibenzeno (95%). Análise cromatográfica (CG-MS) deste óleo comprovaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, identificados como α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, delta-cadineno, germacreno D e γ -muroleno.

2.2.8 – Aspectos Farmacológicos

Estudos realizados com a Piperovatina isolada da *Ottonia frutescens* mostraram um leve efeito de salivação e uma dormência, sensação de queimadura na língua que persistiu por aproximadamente 35 minutos após contato com este composto.

A atividade anestésica local da Piperovatina tem sido apreciada por muito tempo, mas a curta duração de seus efeitos, juntamente com a tendência do composto induzir excesso de salivação, impediu sua aplicação com sucesso em pequenas operações dentais (MAKAPUGAY et al., 1983, p. 235-238).

KUZE RATES, CHAVES e VON POSER (1997, p. 113-116) investigaram o efeito anestésico local (*in vivo*) e a toxicidade do extrato etanólico das raízes de *Ottonia propinqua*, cujos resultados comprovaram a existência de atividade anestésica, sinais de irritação local e DL₅₀ em camundongos de 33 mg/kg, i.p.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico utilizado na elaboração deste trabalho, raízes e partes aéreas da *O. martiana*, foi coletado em abril de 2000, no Município de Guaratuba (encosta da Floresta Atlântica - Serra do Mar), no Estado do Paraná, a uma altitude de 20 metros.

A identificação da espécie botânica foi realizada pelo Botânico Dr. Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal (MBM) da Prefeitura de Curitiba–Paraná, e um exemplar desta espécie (exsicata) encontra-se depositado no Herbário deste Museu, devidamente catalogado e registrado sob número 259.057.

3.2 ESTABILIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO

O material coletado (partes aéreas e raízes) foi submetido a uma dessecação em estufa com tiragem de ar úmido, à temperatura de 40°C durante 48 horas, para estabilizar (~10% de umidade) e conservação em um lugar seco à temperatura de 5 a 15°C (câmara fria), ao abrigo de luz e umidade.

3.3 MÉTODO DE ISOLAMENTO E SEPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS SEGUNDO MIGUEL (1996, p. 28-34)

3.3.1 Obtenção do Extrato Bruto Metanólico

Raízes de *O. martiana* (198,95 g) foram maceradas durante 7 dias, com metanol (95%), por três vezes, para esgotamento total da droga. Após filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40°C) a aproximadamente 1/5 do seu volume. Em seguida, foi armazenado em frasco âmbar

e conservado em freezer por um período de 24 horas, para precipitação de pigmentos.

Decorrido este tempo, a partir da filtração à vácuo, o Extrato Bruto Metanólico das Raízes foi obtido, o qual foi conservado em câmara fria até o momento do preparo das extrações dos seus constituintes.

3.3.2 Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico

Inicialmente, o fracionamento foi realizado através do processo de partição líquido-líquido, sendo o Extrato Bruto Metanólico das Raízes (6,96 g) transferido para um funil de separação de 250 mL e extraído por agitação manual, com solventes de polaridades crescentes.

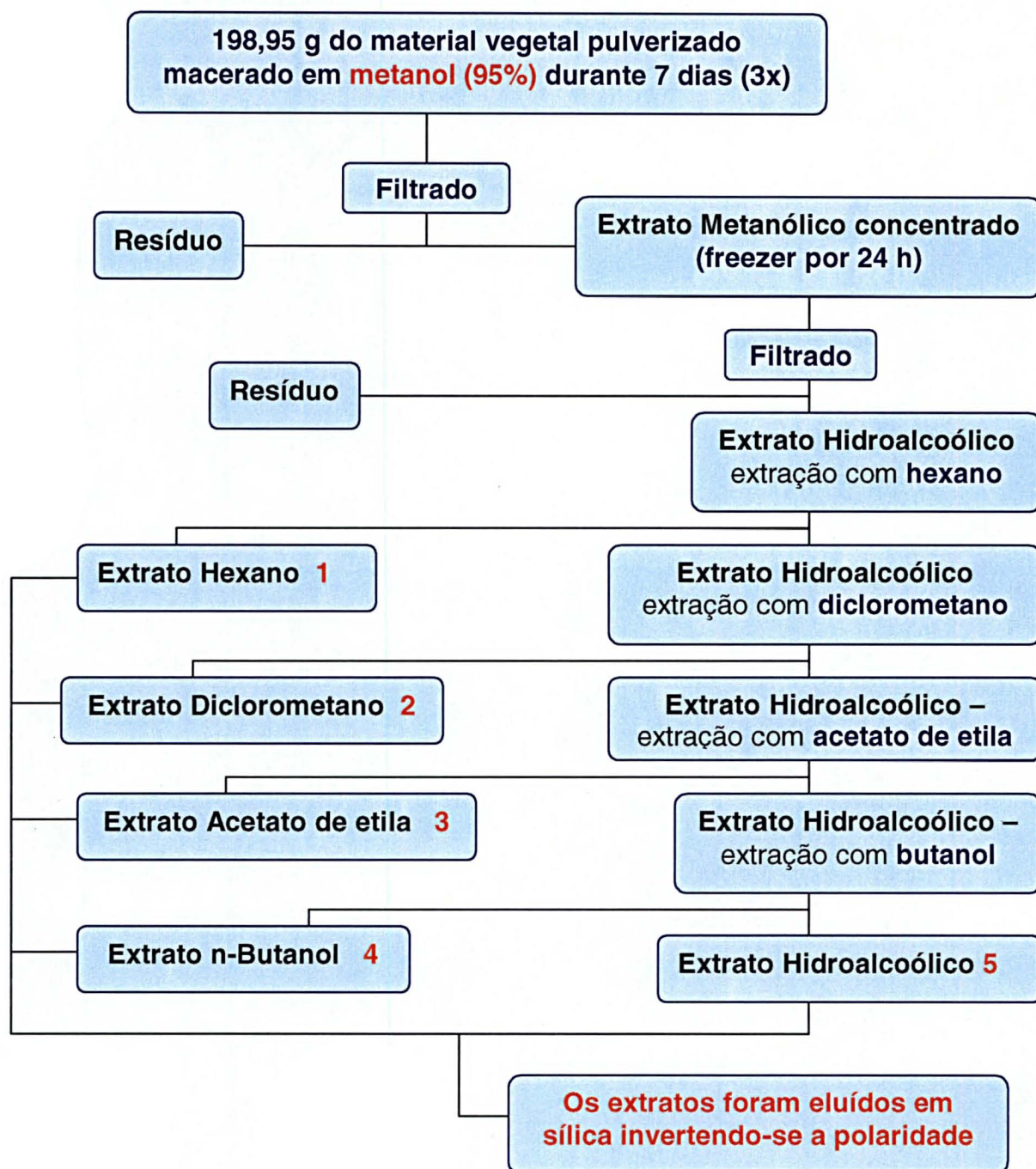
A extração foi realizada inicialmente com hexano, em cinco volumes de 50 mL. O extrato assim obtido foi reservado e o resíduo metanólico novamente extraído por agitação manual, com cinco volumes de 50 mL de diclorometano. Dando-se continuidade a esta extração, foi utilizado o mesmo procedimento com acetato de etila e n-butanol.

Para cada uma dessas extrações esperou-se uma nítida visualização das linhas de separação dos solventes, e após completa separação das fases, os extratos obtidos foram evaporados em rota vapor (40°C), até secura.

Estes extratos obtidos foram denominados de extrato: Hexano **1**, Diclorometano **2**, Acetato de Etila **3**, n-Butanol **4** e Hidroalcoólico **5** (resíduo metanólico), respectivamente.

O esquema do fracionamento por partição líquido-líquido do Extrato Bruto Metanólico das Raízes de *O. martiana*, segundo MIGUEL (1996, p. 31), encontra-se inserido na figura 10 deste trabalho.

FIGURA 10. ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO (L/L)



3.3.3 Purificação dos Extratos Obtidos pelo Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico

A obtenção de frações bem definidas, ou seja, com grupos de polaridade ou estruturas, obtidos por partição líquido-líquido foram submetidos a um fracionamento através do processo de partição sólido-líquido.

Este processo possibilita a obtenção, quase total, de uma substância numa única fração, facilitando seu processo de separação, e conseqüentemente, a obtenção de melhores rendimentos.

Sendo assim, cada fração obtida na partição líquido-líquido, isoladamente e com polaridade decrescente, foi submetida a uma eluição em sílica gel, com solventes de polaridades crescentes, cujos respectivos eluatos foram recolhidos em frações distintas para posterior análise.

Este fracionamento iniciou-se com o Extrato Hidroalcoólico, o qual foi dissolvido com pequena quantidade de metanol, acrescido de 2 partes de sílica gel 60 (70-230 mesh), em relação ao seu peso, e evaporado sob constante homogeneização e leve aquecimento até a obtenção de um pó fino e seco. Esta pastilha acima obtida (fração + sílica gel), foi transferida para um filtro de vidro sinterizado de 15 cm de diâmetro por 10 cm de altura, forrado com um disco de papel de filtro, no qual 100 g de sílica gel estavam acomodadas e cobertas com um outro disco de papel de filtro. Após a transferência desta pastilha para o filtro, novo disco de papel de filtro foi colocado, e este sistema foi eluído com n-butanol (200 mL) e em seguida com metanol (300 mL), obtendo-se frações únicas de cada solvente. Em seguida, o filtro foi eluído com água deionizada. A fração obtida por este processo foi denominada de Fração Metanol ou Hidroalcoólica.

Com o extrato n-butanol adicionado à fração butanol obtida do extrato hidroalcoólico supracitado, iniciou-se nova coluna, nas mesmas condições do extrato hidroalcoólico. Neste caso a eluição foi iniciada com acetato de etila (200 mL), seguida de n-butanol (300 mL) e metanol (200 mL).

A fração acetato de etila obtida nesta eluição foi somada ao extrato acetato de etila, a fração butanol foi somada à fração butanol, e a fração metanol foi somada à fração metanol. Em seguida, o filtro foi eluído com água deionizada.

Com o extrato acetato de etila e a fração acetato de etila obtida do extrato butanol, foi iniciada nova coluna, começando neste caso a eluição com diclorometano (200 mL), seguida de acetato de etila (300 mL), butanol (200 mL) e metanol (200 mL). A fração diclorometano foi adicionada ao extrato diclorometano, a fração acetato de etila foi somada à fração acetato de etila, a fração butanol somada à fração butanol, e a fração metanol à fração metanol. Em seguida, o filtro foi eluído com água deionizada.

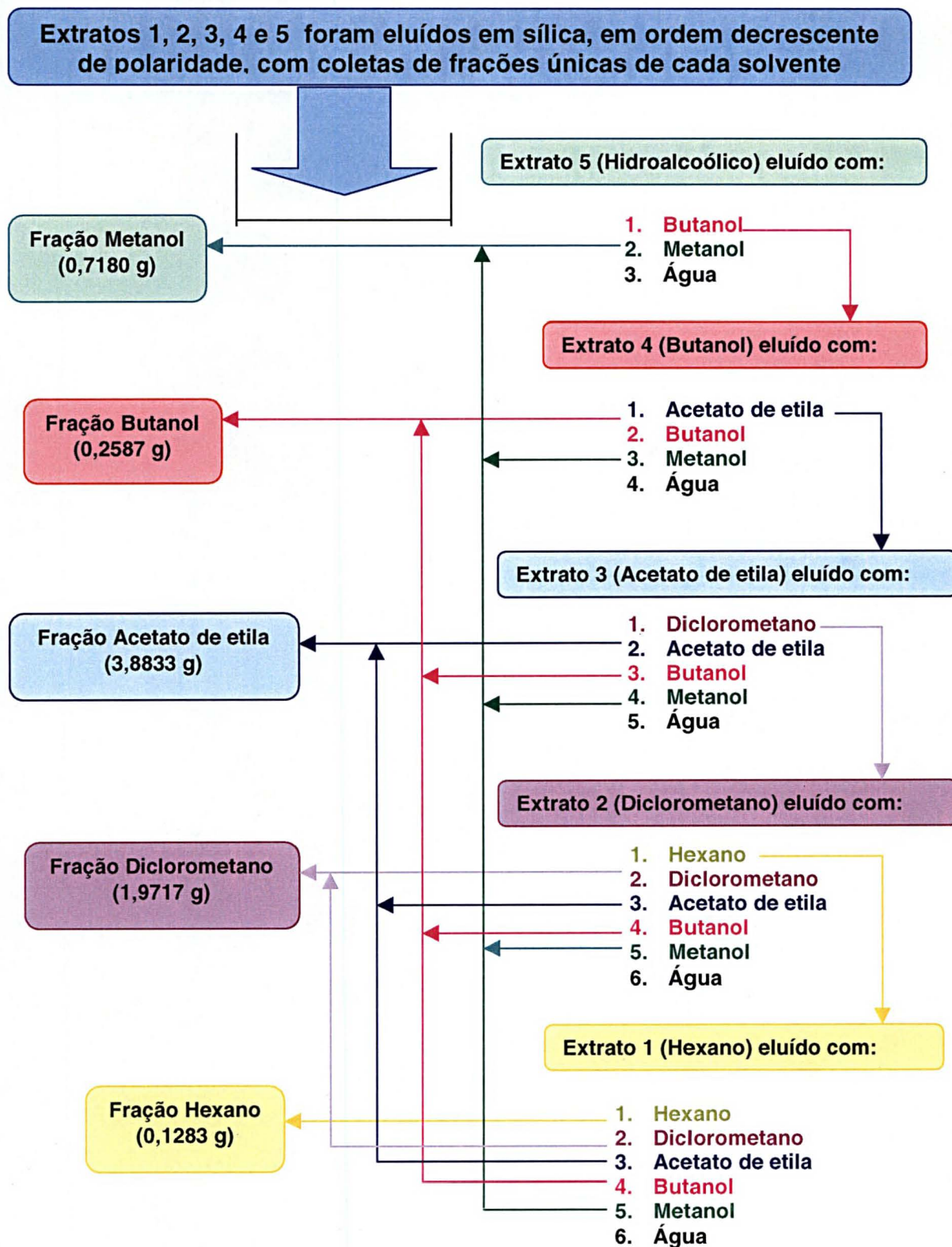
Da mesma forma que a anterior, com o extrato diclorometano e a fração diclorometano obtida do extrato acetato de etila foi iniciada nova coluna, iniciando-se neste caso a eluição com hexano (200 mL), seguida de diclorometano (300 mL), acetato de etila (200 mL), butanol (200 mL) e metanol (200 mL), respectivamente. Cada fração obtida foi somada aos respectivos extratos e frações de mesmo solvente. Em seguida, o filtro foi eluído com água deionizada.

Procedeu-se do mesmo modo com o extrato hexano, sendo cada fração obtida somada às respectivas frações de mesmo solvente.

Através deste processo, cinco frações distintas foram obtidas (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e metanol), as quais foram concentradas em rota vapor, até secura.

A figura 11 deste trabalho apresenta o esquema de extração sólido-líquido utilizado para a purificação dos extratos, segundo MIGUEL (1996, p. 33).

FIGURA 11 - ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO (S/L) DOS EXTRATOS OBTIDOS POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO



3.3.4 Separação dos Constituintes da Fração Diclorometano (FD) por Cromatografia em Coluna (CC)

Foram separados somente constituintes da fração diclorometano, onde esperava-se encontrar alta concentração de amidas, com marcantes atividades biológicas.

3.3.4.1 Preparo da pastilha:

Para a separação dos constituintes desta fração, foi preparada uma pastilha, onde a fração foi acrescida de 2 partes de sílica gel 60 em relação ao seu peso e evaporado à secura, sob constante homogeneização e leve aquecimento.

3.3.4.2 Procedimento:

A pastilha da fração diclorometano foi cromatografada em uma coluna de 3 cm de diâmetro e 40 cm de altura, contendo 50 g de sílica gel 60 (70-230 mesh). Iniciou-se a eluição com hexano:acetato de etila (100:00 - v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de acetato de etila na ordem de 5%, até acetato de etila puro. A partir daí, fez-se a eluição com acetato de etila e metanol, em concentração de metanol crescente na ordem de 5%, até metanol puro.

Os eluatos foram coletados em 98 frascos de aproximadamente 20 mL, os quais foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se o sistema diclorometano: metanol: água (95:05:0,50 -v/v/v) como fase móvel.

Utilizou-se ácido tricloroacético a 25% em clorofórmio como visualizador, cuja visualização no UV apresentou coloração amarela para amidas e após aquecimento, coloração azul.

Foi verificado na fração diclorometano 12 a presença de um sólido branco com traços de substâncias oleosas, o qual foi dissolvido em hexano e precipitado à frio.

Por filtração, este precipitado foi separado e em seguida lavado com hexano à frio, obtendo-se 0,0197g de cristais incolores, os quais passaram a ser denominados de OMA 1. Após monitoramento por CCD, OMA 1 foi submetida à identificação por meio de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e por comparação com amostras autênticas.

A precipitação de um sólido branco amarelado e com traços de substâncias oleosas foi verificada na fração 14. A separação foi realizada pelo mesmo processo utilizado na fração diclorometano 12, sendo isolado 0,0063 g de uma substância (um sólido branco), denominada de OMA 2, a qual foi monitorada por CCD e encontra-se em fase de identificação por meio de métodos espectroscópicos.

Na fração diclorometano 20, um precipitado branco com traços de substâncias oleosas também foi observado, o qual foi dissolvido em hexano à frio. Por filtração, o precipitado formado foi separado e em seguida lavado com hexano à frio, rendendo 0,0289 g de uma substância (cristais brancos), denominada de OMA 3, a qual foi submetida à identificação por meio de espectroscopia de ^1H RMN e ^{13}C e por comparação com amostras autênticas.

Novamente foi observado um precipitado branco com traços de substâncias oleosas, porém, na fração diclorometano 26, o qual foi dissolvido em hexano à frio. Por filtração à vácuo, o precipitado formado foi separado e em seguida lavado com hexano à frio, obtendo-se 1,6689 g de uma substância impura (sólido branco amarelado), denominada de OMA 4, a qual foi submetida à análise cromatográfica em camada delgada (CCD) e comparação com amostras autênticas, encontrando-se em fase de identificação por meio de métodos espectroscópicos.

A fração única, resultante da reunião das frações 21 a 23 (insolúvel em hexano), foi dissolvida em acetato de etila, precipitada a frio, ou seja, resfriada no freezer por uns 30 minutos, e separada por filtração à vácuo, seguida da lavagem com acetato de etila à frio, resultando desta forma em 0,6946 g de cristais brancos, denominados de OMA 5A, e 3,2285 g de um precipitado pastoso de cor marrom (solúvel no clorofórmio e insolúvel no metanol), denominado de OMA 5B, os quais não foram analisados devido à presença de alta concentração de açúcares e mucilagens nestas amostras.

A fração única, resultante da reunião das frações 25, 26 e 27 foi dissolvida em hexano à frio, e o precipitado formado separado por filtração à vácuo. Em seguida, foi lavado com hexano à frio, rendendo 0,0296 g de uma substância impura (um sólido branco amarelado), denominada de OMA 6, a qual foi monitorada por CCD, encontrando-se em fase de identificação por meio de métodos espectroscópicos.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FD

As substâncias isoladas foram comparadas com amostras autênticas por CCD e identificadas por meio de espectroscopia de ^1H RMN e ^{13}C RMN.

Para tal, utilizou-se Espectrofotômetro de Brucker, modelo AC-200E, operando-se a 400 MHz para ^1H RMN e a 70 MHz para ^{13}C RMN. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidades (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. O solvente utilizado na espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C foi CDCl_3 e como referência interna utilizou-se TMS.

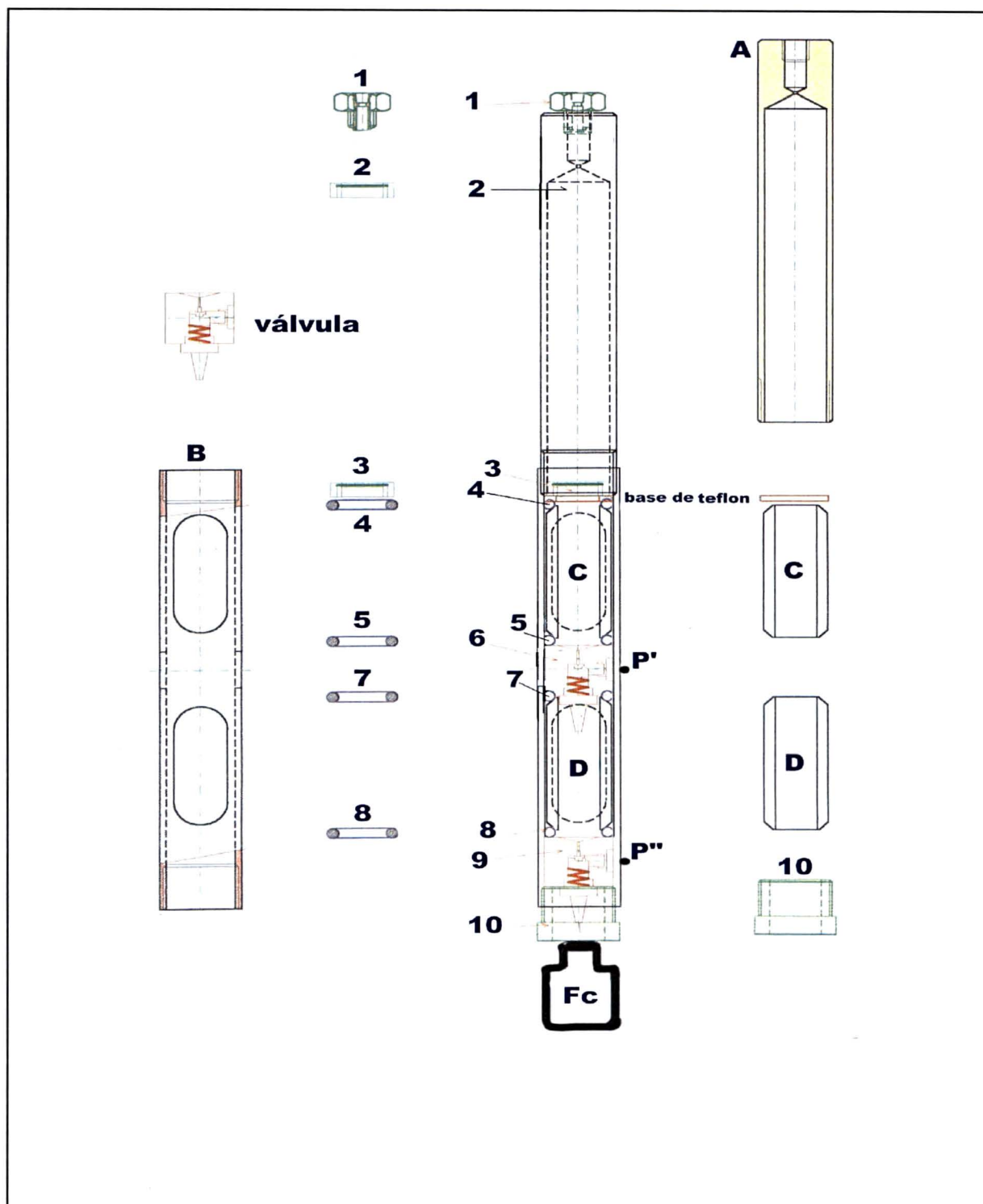
3.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS PELO EQUIPAMENTO PORTÁTIL EXTRATOR PARA OPERAÇÕES COM GASES LIQÜEFEITOS (OLIVEIRA, PI 9804199-1, 16-10-1998)

Frutos em pó (4,98 g) de *O. martiana* foram submetidos à cinco extrações, utilizando-se um Equipamento Portátil Extrator para Operações com Gases Liqüefeitos, e cujo funcionamento e metodologia encontram-se descritos abaixo.

3.5.1 Descrição do Equipamento Portátil Empregado para Extração de Produtos Naturais.

Segundo OLIVEIRA (1997), o conjunto extrator é constituído de dois corpos cilíndricos tubulares **A** e **B**, devidamente rosqueados e vedados entre si, cujo esquema encontra-se inserido na figura 12 deste trabalho.

FIGURA 12 - ESQUEMA DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL EXTRATOR PARA OPERAÇÕES COM GASES LIQÜEFEITOS



O corpo **A**, construído em aço inoxidável, possui em uma das extremidades uma válvula (1), através da qual faz-se a alimentação do solvente (hidrocarboneto liqüefeito). Logo abaixo da referida válvula é inserida um conjunto de telas (2), que tem por função evitar o entupimento da válvula de alimentação do solvente (1), e outro conjunto de telas (3), colocado posterior ao carregamento do material vegetal a ser processado, para evitar problemas de bloqueio e/ou entupimento das válvulas posteriores contidas no corpo **B** (6 e 9): a dos compartimentos de separação e a que permite a transferência do extrato para o frasco coletor.

O corpo **B** é constituído de duas câmaras (C e D), interconectadas por meio de uma válvula (6), a qual permite o isolamento entre elas. A existência destas duas câmaras permite isolar a fase aquosa da fase orgânica, quando processa-se amostra com elevada concentração de água. Ambas as câmaras possuem uma parte tubular de vidro, que permite visualizar a operação de separação das fases. O conjunto formado pelas câmaras **C** e **D** que aloja o extrato isolado do material vegetal contido no corpo **A**, comunica-se com o exterior por outra válvula, semelhante àquela anteriormente citada (9), possibilitando a transferência do extrato para um frasco coletor (Fc), por uma agulha, sem contato do mesmo com o meio ambiente.

A montagem do conjunto faz-se momentos antes do processo de extração, visto que seus componentes são de configuração extremamente simples e de fácil limpeza, permitindo que a operação seja efetuada em aproximadamente cinco minutos.

A estanqueidade do conjunto é assegurada pelo uso de anéis de elastômero de borracha nitrílica (4, 5, 7 e 8), colocados entre cada componente do extrator (tubos de vidro e válvulas).

As válvulas, confeccionadas em "teflon" e aço inoxidável, que em condição de repouso permanecem normalmente fechadas, são operadas pela compressão de um pequeno pino voltado para a parte externa da referida válvula (P' e P"). A pequena vazão através das válvulas permite facilmente controlar a transferência de fluido, tanto na etapa de separação das fases (P'), quanto no envase para o frasco coletor (P"). Interrompendo-se a compressão do pino, o fluxo é imediatamente estancado.

3.5.2 Operação do Extrator

Estando o equipamento desmontado, inseriu-se no fundo do corpo **A** um dos conjuntos de telas (2). Em seguida, alimentou-se este corpo cilíndrico com material vegetal que se desejava obter extrato (4,98 g de frutos em pó de *O. martiana*), colocando-se na parte superior o outro conjunto de telas (3), seguido por uma base de "teflon" e um anel de vedação (4). A este corpo metálico **A**, rosqueou-se o outro segmento, o corpo **B**, previamente montado, contendo os dutos de vidro e válvulas intercalados por anéis de vedação (5, 7 e 8). Finalmente, um terminal metálico (10), foi rosqueado à outra extremidade, o qual, por compressão dos anéis de borracha aos segmentos que constitui o conjunto extrator, garantiu vedação entre os compartimentos e o meio externo.

Colocando-se o conjunto extrator na posição vertical, fez-se a alimentação do solvente GLP através da válvula superior (1) pela simples compressão da garrafa de GLP contra a válvula do equipamento (1). Uma vez transferida a massa de solvente desejada, e controlada por pesagens da garrafa de GLP, o conjunto extrator foi mantido na posição vertical, com a base que possui a válvula de alimentação voltada para baixo, o tempo necessário que se tenha estimado como suficiente para que ocorresse o equilíbrio, e então procedeu-se a coleta de extrato.

Transcorrido o tempo de contato entre o solvente e a amostra, deslocou-se o conjunto, deixando-se a parte que contém a válvula de alimentação (1) voltada para cima. Nesta posição, o extrato percolou através do segundo filtro, passando ao compartimento de vidro, o que permitiria proceder a separação da fase aquosa, se houvesse, para o compartimento inferior (D) pela simples compressão da válvula (P'), a qual, uma vez transferida para o compartimento inferior, poderia ser coletada pelo acoplamento a um frasco de coleta por meio de uma agulha conectada à base da válvula (9) comprimida (P").

Na existência de água, seria necessário coletar ou descartar esta fase, para só então isolar a fase orgânica, procedendo-se da mesma maneira como na operação da fase aquosa.

Como neste experimento a fase aquosa foi inexistente, a operação de transferência e coleta da fase orgânica se fez pelo mesmo processo acima descrito.

O frasco de coleta foi mantido em um suporte apropriado com tampa constantemente ajustada, mantendo o extrato em GLP liqüefeito dentro do frasco isolado do conjunto extrator até o momento da operação de “flasheamento”.

Como a total exaustão do material vegetal, ou seja, daquelas substâncias passíveis de extração pelo solvente, não ocorre em um único ciclo, procedeu-se outras extrações no mesmo material sem a necessidade de desmontar o conjunto, bastando apenas realimentar o sistema com outras cargas de solvente. Desta forma tornou-se possível avaliar o perfil do extrato obtido após cada ciclo (5 extrações).

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos brutos etanólicos das raízes e caules de *O. martiana* foi utilizado o método por difusão em gel, adaptado de SMÂNIA e DELLE MONACHE (1995, p. 177-181), ULUBELEN et al. (2000, p. 458-462) e ROMEIRO (2001), buscando-se encontrar alguma atividade inibitória do desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Esta avaliação baseou-se na inoculação de uma solução padronizada de um dado microrganismo em um meio de cultura específico, na adição de discos de papel impregnados com soluções padronizadas das amostras em estudo a este meio, na difusão através do meio de cultura, das substâncias impregnadas nos discos, e na incubação a uma determinada temperatura favorável ao desenvolvimento deste microrganismo.

Pela formação de halo de não-crescimento (halo de inibição) ao redor do disco impregnado, a atividade antibacteriana do extrato em estudo fica comprovada.

3.6.1 Obtenção dos Extratos Brutos Etanólicos (EBEtOH)

Caules (116,05 g) e raízes (67,56 g) de *O. martiana* foram macerados isoladamente durante 7 dias, com etanol (95%), processo realizado por três vezes, para completo esgotamento da droga. O material foi concentrado em rota vapor (40°C) a aproximadamente 1/5 do seu volume e este conservado em freezer, por um

período de 24 horas. A partir da filtração sob vácuo, os EBEtOH do Caule (12 mL) e das Raízes (10 mL) foram obtidos.

3.6.2 Preparo das Amostras

Pela diluição do EBEtOH das raízes e dos caules foram obtidas as amostras a serem impregnadas nos discos de papel nas concentrações de 50, 25 e 12,5%. No preparo das amostras, 1 mL de cada EBEtOH foi transferido separadamente para um tubo de ensaio estéril e em seguida adicionado a 1 mL de etanol, obtendo-se assim uma diluição a 50%. Destas, 1 mL foi transferido sucessivamente para outro tubo de ensaio e como anteriormente descrito, adicionado a 1 mL de etanol, obtendo-se desta maneira uma diluição a 25%, de onde 1 mL foi transferido para outro tubo de ensaio e adicionado a 1 mL de etanol, resultando em uma diluição a 12,5%.

3.6.3 Preparo dos Discos de Papel

Os discos de papel (6 mm de diâmetro) foram espalhados numa Placa de Petri, devidamente identificados e impregnados com 20 µL das amostras previamente preparadas. Para cada concentração da amostra foram impregnados seis discos, os quais ficaram em repouso até secagem completa.

Também foram preparados discos controles impregnados apenas com os solventes utilizados na obtenção dos extratos.

3.6.4 Preparo do Meio de Cultura

O meio de cultura ágar Mueller-Hinton (ULUBELEN et al., 2000, p. 458-462) foi escolhido por ser um meio não enriquecido, porém suficientemente nutritivo para permitir o perfeito desenvolvimento das colônias bacterianas.

O meio foi autoclavado (120°C por 15 minutos) e à temperatura de aproximadamente 50°C, 60 mL do meio de cultura foram vertidos em placas de 15 cm de diâmetro previamente esterilizadas, as quais foram reservadas para a inoculação das cepas.

3.6.5 Preparo do Inóculo

Foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), todas fornecidas pela Tecpar, as quais foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas à 35°C, 24 horas antes do teste.

Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 mL de salina estéril. Desta suspensão, transferiu-se 1 mL para um tubo estéril e diluiu-se com salina estéril, obtendo-se suspensões bacterianas com características exibidas na tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Microrganismo testado	Absorbância da Suspensão (580 nm)	Total de Bactérias na Suspensão (UFC/mL)
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0,30	$3,7.10^{12}$
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,30	$1,0.10^9$
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	0,40	$1,0.10^{12}$

No momento da inoculação das placas, 1 mL de cada suspensão padronizada foi adicionada a 100 mL de ágar Mueller-Hinton fundido à temperatura de 45°C. Antes da solidificação, 10 mL deste meio foram transferidos rapidamente para a superfície das placas de meio de cultura previamente preparadas, sob rápida homogeneização, de modo a obter-se uma fina camada homogênea do inóculo bacteriano.

3.6.6 Teste de Atividade Antibacteriana

Para cada um dos extratos testados procedeu-se da seguinte maneira: em cada placa inoculada, foram distribuídos seis discos de papel impregnados com o extrato bruto etanólico puro, e diluído a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, além de um disco impregnado apenas com o solvente utilizado para a obtenção do extrato e um disco de controle positivo com cloranfenicol.

O teste foi realizado em duplicata, e as placas inoculadas foram incubadas em estufa a 35°C, durante 24 horas. Passado este período, as placas foram retiradas da estufa e foram medidos os halos de inibição, quando presentes.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a determinação da atividade fungitóxica dos extratos brutos etanólicos e aquosos de *O. martiana*, foi utilizado o método de incorporação de extratos vegetais em meio de cultura adaptado de AUER e BETTIOL (1986, p. 50) e de STANGARLIN et al. (1999, p. 16-21), buscando-se encontrar alguma inibição no crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum* (café), *Colletotrichum acutatum* (morango), *Rhizoctonia* sp.(erva-mate), fornecidos pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (PR), além de *Cylindrocladium spathulatum* (erva-mate), fornecido pela EMBRAPA Florestas (PR).

3.7.1 Obtenção do Extrato Bruto Aquoso (EBaquoso)

Folhas frescas (15 g) e folhas estabilizadas (10 g) de *O. martiana* foram trituradas em água destilada por um minuto em liquidificador e a partir da filtração em algodão e à vácuo, em funil de vidro sinterizado, os Extratos Brutos Aquosos (EBaquosos) foram obtidos.

3.7.2 Obtenção de EBEtOH e Extratos Secos

Os EBEtOH dos caules e raízes foram obtidos segundo o item 3.6.1, os quais foram utilizados tanto para a avaliação da atividade antibacteriana, quanto para a avaliação da atividade antifúngica.

Além destes extratos etanólicos, foi obtido 0,1482 g de extrato seco de folhas estabilizadas (15,1356 g) de *O. martiana*, pelo processo de extração com etanol (85%) em Soxhlet, durante um período de 6 horas, o qual após este período de extração, foi evaporado à completa secura em banho-maria (50°C), obtendo-se desta forma o Extrato Seco de Folhas Estabilizadas de *O. martiana*.

Também, por extração de 24,5 g dos frutos da *O. martiana* em Soxhlet (48 h) foram obtidos os seguintes extratos secos: 1,5820 g da fração hexano, 0,4082 g da fração clorofórmio, 0,3555 g da fração acetato de etila e 1,6231 g da fração metanol.

3.7.3 Crescimento Micelial

Os extratos brutos aquosos (folhas frescas) e etanólicos (caules e raízes) foram incorporados separadamente em meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar), cada um nas concentrações de 50, 25 e 12,5 % (em relação ao BDA), e, autoclavados a 120°C e 1 atm por 15 minutos. O meio BDA contendo extrato foi vertido em placas de Petri (15 cm de diâmetro) e após uma hora de resfriamento, fez-se a inoculação com esporos dos fungos *F. oxysporum*, *C. acutatum* e *Rhizoctonia* sp., retirados de culturas puras com 7 dias de idade em meio BDA. A seguir, as placas foram incubadas a 25°C no escuro, após vedação com filme plástico. O tratamento controle continha apenas o meio BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições. As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), após cinco dias de incubação dos patógenos.

Antes da esterilização, o pH das soluções encontrava-se em torno de 5,5 (extratos etanólicos) e 6,4 (extratos aquosos).

O teor alcoólico dos extratos brutos etanólicos obtidos por meio de microdestilação foi inferior a 0,01%.

Como os extratos supracitados apresentaram atividade antifúngica, foram testados outros extratos (Ebaquosos e extrato seco etanólico de folhas estabilizadas), substituindo-se o patógeno *Rhizoctonia* sp. pelo *C. spathulatum*, devido à cultura do mesmo não encontrar-se mais pura.

Para tal, 48 horas após o meio ter sido vertido em placas de Petri, discos de micélio-ágar com 5 mm de diâmetro dos primeiros patógenos testados (*F. oxysporum*, *C. acutatum*) mais um isolado de *C. spathulatum*, retirados das culturas puras com 15 dias de idade em meio BDA, foram transferidos isoladamente para o centro de cada placa nos substratos preparados. A seguir, as placas foram incubadas a 25°C no escuro, após vedação com filme plástico. O tratamento controle continha apenas o meio BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições.

As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), no momento em que as colônias fúngicas do tratamento controle atingiram aproximadamente a superfície total do meio de cultura.

3.7.4 Teste de Antagonismo

Além das avaliações supracitadas, um teste de antagonismo entre os isolados dos patógenos utilizados neste experimento foi realizado, utilizando-se o método adaptado de MARIANO (1993, p. 369-409), onde 48 horas após o meio BDA ter sido vertido em placas de Petri, dois discos de micélio com 5 mm de diâmetro, um de cada patógeno testado, foram colocados de forma diametralmente oposta na placa. A seguir, as placas foram incubadas a 25°C no escuro, após vedação com filme plástico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições.

As avaliações foram realizadas por meio de medições do raio das colônias, no momento em que os bordos das colônias fúngicas se tocaram.

3.7.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Alíquotas de 50 µL do EBEtOH das folhas secas e estabilizadas e das quatro frações obtidas da extração dos frutos da *O. martiana* por Soxhlet (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) foram utilizadas para a CCD, empregando-se o método de STANGARLIN et al. (1999, p. 16-21) adaptado. Placas de Sílica-gel GF₂₅₄, pré-lavadas com clorofórmio:metanol (1:1, v/v), foram preparadas e após a aplicação das amostras sobre as placas e secagem sob fluxo de ar, realizou-se a separação dos compostos utilizando-se o sistema diclorometano: metanol: água (95:05:0,5 - v/v/v). Os compostos foram visualizados sob luz visível e ultravioleta (UV) a 365 nm (longo) e 254 nm (curto) e em seguida, as placas secas contendo as bandas individuais foram aspergidas com suspensão de esporos de *F. oxysporum* ($1,4 \times 10^6$ esporos / 0,4 mL de meio líquido Batata-dextrose - BD, 10 pulverizações), *C. acutatum* (1×10^6 esporos/ 0,2 mL de meio líquido BD, 5 pulverizações) e *C. spathulatum* (1×10^5 esporos/ 1,6 mL de meio líquido BD, 40 pulverizações), sendo mantidas sob umidade relativa de 100% a 25°C e luz. Após 7 dias, verificou-se nas placas em estudo, se havia presença de zonas de inibição de crescimento micelial ao redor das bandas individuais.

3.7.6 Análise Estatística

Como o delineamento experimental da atividade antifúngica (crescimento micelial e teste de antagonismo) foi inteiramente casualizado, na análise estatística dos resultados obtidos, empregou-se o Teste de Tukey com limite de confiança de 95%, utilizando-se o programa SANEST (ZONTA; MACHADO; SILVEIRA, 1984).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS TOTAIS

Foram obtidos 6,96 g de Extrato Bruto Metanólico Total, para a realização de isolamento de substâncias químicas.

Para a avaliação das atividades antimicrobianas (antibacteriana e fungitóxica), 12 mL de Extrato Bruto Etanólico dos Caules e 10 mL de Extrato Bruto Etanólico das Raízes foram preparados.

Além destes, 400 mL de Extrato Bruto Aquoso de folhas frescas, 500 mL de Extrato Bruto Aquoso de folhas estabilizadas e 0,1482 g de extrato etanólico seco de folhas estabilizadas diluído em 500 mL de água destilada foram obtidos para a realização do teste de atividade antifúngica.

As concentrações dos extratos brutos totais supracitados encontram-se inseridos na tabela 3 abaixo.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO E pH DOS EXTRATOS BRUTOS TOTAIS DA *O. martiana*

Extrato Bruto Total (EBT)	Órgão Vegetal Utilizado	Rendimento do EBT	Rendimento % em Relação à Massa do Órgão Vegetal Utilizada (m/m)	Rendimento % em Relação ao Volume do EBT (m/v)	pH
Metanólico	Raízes * (198,95 g)	6,96 g (29,47 mL ^{***})	3,50	6,01	5,5
Etanólico	Caules * (116,05 g)	2,6713 g em 12 mL	2,30	22,26	5,5
Etanólico	Raízes * (67,56 g)	0,2045 g em 10 mL	0,30	2,04	5,5
Aquoso	Folhas ** (24 g)	1,6200 g em 400 mL	6,75	0,40	6,4
Aquoso	Folhas * (10 g)	1,2875 g em 250 mL	12,87	0,51	6,4
Extrato Seco (etanólico)	Folhas* (15,1356 g)	0,1482 g (58 mL ^{***})	0,98	0,25	6,5

* Material estabilizado (seco)

** Material Fresco

*** Volume de extrato levado à completa secura

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS TOTAIS

Foram obtidos 6,96 g de Extrato Bruto Metanólico Total, para a realização de isolamento de substâncias químicas.

Para a avaliação das atividades antimicrobianas (antibacteriana e fungitóxica), 12 mL de Extrato Bruto Etanólico dos Caules e 10 mL de Extrato Bruto Etanólico das Raízes foram preparados.

Além destes, 400 mL de Extrato Bruto Aquoso de folhas frescas, 500 mL de Extrato Bruto Aquoso de folhas estabilizadas e 0,1482 g de extrato etanólico seco de folhas estabilizadas diluído em 500 mL de água destilada foram obtidos para a realização do teste de atividade antifúngica.

As concentrações dos extratos brutos totais supracitados encontram-se inseridos na tabela 3 abaixo.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO E pH DOS EXTRATOS BRUTOS TOTAIS DA *O. martiana*

Extrato Bruto Total (EBT)	Órgão Vegetal Utilizado	Rendimento do EBT	Rendimento % em Relação à Massa do Órgão Vegetal Utilizada (m/m)	Rendimento % em Relação ao Volume do EBT (m/v)	pH
Metanólico	Raízes * (198,95 g)	6,96 g (29,47 mL ^{***})	3,50	6,01	5,5
Etanólico	Caules * (116,05 g)	2,6713 g em 12 mL	2,30	22,26	5,5
Etanólico	Raízes * (67,56 g)	0,2045 g em 10 mL	0,30	2,04	5,5
Aquoso	Folhas ** (24 g)	1,6200 g em 400 mL	6,75	0,40	6,4
Aquoso	Folhas * (10 g)	1,2875 g em 250 mL	12,87	0,51	6,4
Extrato Seco (etanólico)	Folhas* (15,1356 g)	0,1482 g (58 mL ^{***})	0,98	0,25	6,5

* Material estabilizado (seco)

** Material Fresco

*** Volume de extrato levado à completa secura

4.2. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO

O particionamento do extrato bruto metanólico (EBMeOH), em duas etapas, ou seja, por partição líquido/líquido seguida pela prévia purificação através da partição sólido/líquido, resultou na obtenção de cinco frações bem definidas, as quais se encontram inseridas na tabela 4, abaixo.

TABELA 4 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO SÓLIDO/LÍQUIDO DO EBMeOH DAS RAÍZES DA *O. martiana*

Fração	Rendimento (g)	Rendimento (%) em relação ao EBT (6,96 g)	Rendimento (%) em relação ao material de partida (198,95 g de raízes)
Hexano	0,1283	1,84	0,06
Diclorometano	1,9717	28,33	0,99
Acetato de etila	3,8833	55,79	1,95
Butanol	0,2587	3,72	0,13
Metanol	0,7180	10,32	0,36

4.3 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DICLOROMETANO OBTIDA POR PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

Das frações obtidas por partição sólido/líquido, as frações diclorometano e acetato de etila apresentaram um rendimento maior quando comparadas ao rendimento das outras frações.

Como era de interesse a busca de substâncias que apresentassem atividades biológicas (ação anestésica, atividade antibacteriana e antifúngica), trabalhou-se somente com a fração diclorometano, na qual esperava-se encontrar uma grande concentração de amidas, compostos com marcantes atividades biológicas segundo a literatura científica (SENGUPTA; RAY, 1987, p. 147; MAKAPUGAY et al., 1983 e KUZE RATES; CHAVES; VON POSER, 1997, p. 113-116). Sendo assim, as outras frações obtidas não foram analisadas. Além do mais, outros fatores contribuíram para que as mesmas não fossem analisadas, tais como:

a complexidade de substâncias presentes em pequenas quantidades e as altas concentrações de gomas, mucilagens e açúcares. Estes fatores indicaram a necessidade de se proceder uma nova coleta de material vegetal, numa quantidade maior que a utilizada neste trabalho, a fim de propiciar o isolamento e identificação das mesmas.

O resultado da separação dos constituintes das frações obtidas por partição sólido-líquido encontra-se inserido na tabela 5 deste trabalho.

TABELA 5 - RESULTADO DA SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO EBM_{EtOH} DAS RAÍZES DA *O. martiana*

FRAÇÃO RESULTANTE DA PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	Separação dos constituintes	Rendimento em gramas (g)	Aspecto físico
FRAÇÃO DICLOROMETANO	OMA 1	0,0197	Cristais incolores
	OMA 2	0,0063	Sólido branco amarelado
	OMA 3	0,0289	Sólido branco
	OMA 4	1,6689	Sólido branco amarelado
	OMA 5a	0,6946	Sólido branco amarelado
	OMA 5b	3,2285	Pastoso de cor marrom
	OMA 6	0,0296	Sólido branco amarelado

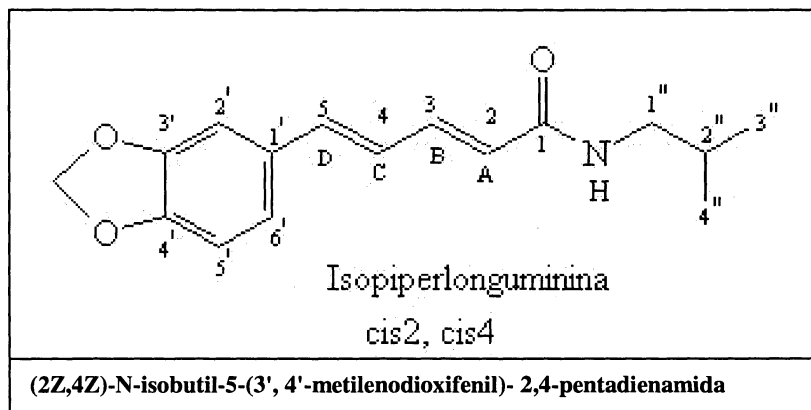
4.4 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FD

4.4.1 Determinação Estrutural do Composto OMA 1

A análise dos dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C do composto isolado OMA 1, juntamente com os dados de literatura, permitiram elucidar a identidade do mesmo, como sendo a substância Isopiperlonguminina (fig. 13), cuja

estrutura foi confirmada pelos dados dos deslocamentos químicos dos seus carbonos.

FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA OMA 1



O espectro de ^1H RMN (fig. 14) apresentou os seguintes resultados:

- A. Um dubleto a 0,94 ppm (6H, d) referente a um grupo isopropil de prótons do $\text{C}_{3''}$ e $\text{C}_{4''}$.
- B. Um multipletto a 1,83 ppm (1H, m) referente ao próton de $\text{C}_{2''}$.
- C. Um duplo dubleto a 3,17 ppm (2H, dd), apesar de assinalar como triplete (2H, t, $J = 7$ Hz), referentes aos prótons do $\text{C}_{1''}$.
- D. Um dubleto a 5,68 ppm (H_A , d, $J=11,4$ Hz e NH , br.), referente ao próton do C_2 .
- E. Um triplete a 6,88 ppm (H_B , t, $J=11,4$ Hz), referente ao próton do C_3 .
- F. Um triplete a 7,47 ppm (H_C , t, $J=11,4$ Hz), referente ao próton do C_4 .
- G. Um dubleto a 6,68 ppm (H_D , d, $J=11,4$ Hz), referente ao próton do C_5 .
- H. Um singletto a 6,80 ppm (3H, s), referente aos prótons do $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{5'}$ e $\text{C}_{6'}$.
- I. Um singletto a 5,96 ppm (2H, s), referente aos prótons do $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$.

No espectro de ^1H RMN, o duplo dubleto a 3,17 ppm (2H, dd), apesar de assinalar como triplete ($J=7$ Hz), o qual é especificado para um radical $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}$ agrupado referente aos prótons do $\text{C}_{1''}$, deveria aparecer como um quarteto ($J_{\text{CH}-\text{NH}} = J_{\text{CH}-\text{CH}}$), porém, de acordo com PINDER e PRICE (1967) os dois sinais se sobrepõem e estes sob deuteração vão para um dubleto centralizado a 3,12 ppm, assinalando como triplete.

Dúvidas sobre as indicações precisas para os prótons do C₃ e C₄ foram dispensadas, pois os sinais apresentados no espectro de ¹H RMN foram consistentes com os apresentados por COSTA e MORS (1981, p. 1307), os quais utilizaram a técnica "spin tickling" (dupla irradiação), para elucidar as diferenças observadas entre os espectros dos isômeros Piperlonguminina e Isopiperlonguminina, em relação aos prótons β para o grupo carbonila da amida.

O aparelho de 400 MHz foi capaz de revelar a posição dos prótons desta amida e as constantes de acoplamento dos prótons H_A, H_B, H_C e H_D.

Os dados do espectro de ¹H RMN da substância OMA 1 foram consistentes com os da substância Isopiperlonguminina, citados pela literatura científica (COSTA; MORS, 1981, p. 1307).

FIGURA 14A - ESPECTRO DE ^1H RMN - OMA 1

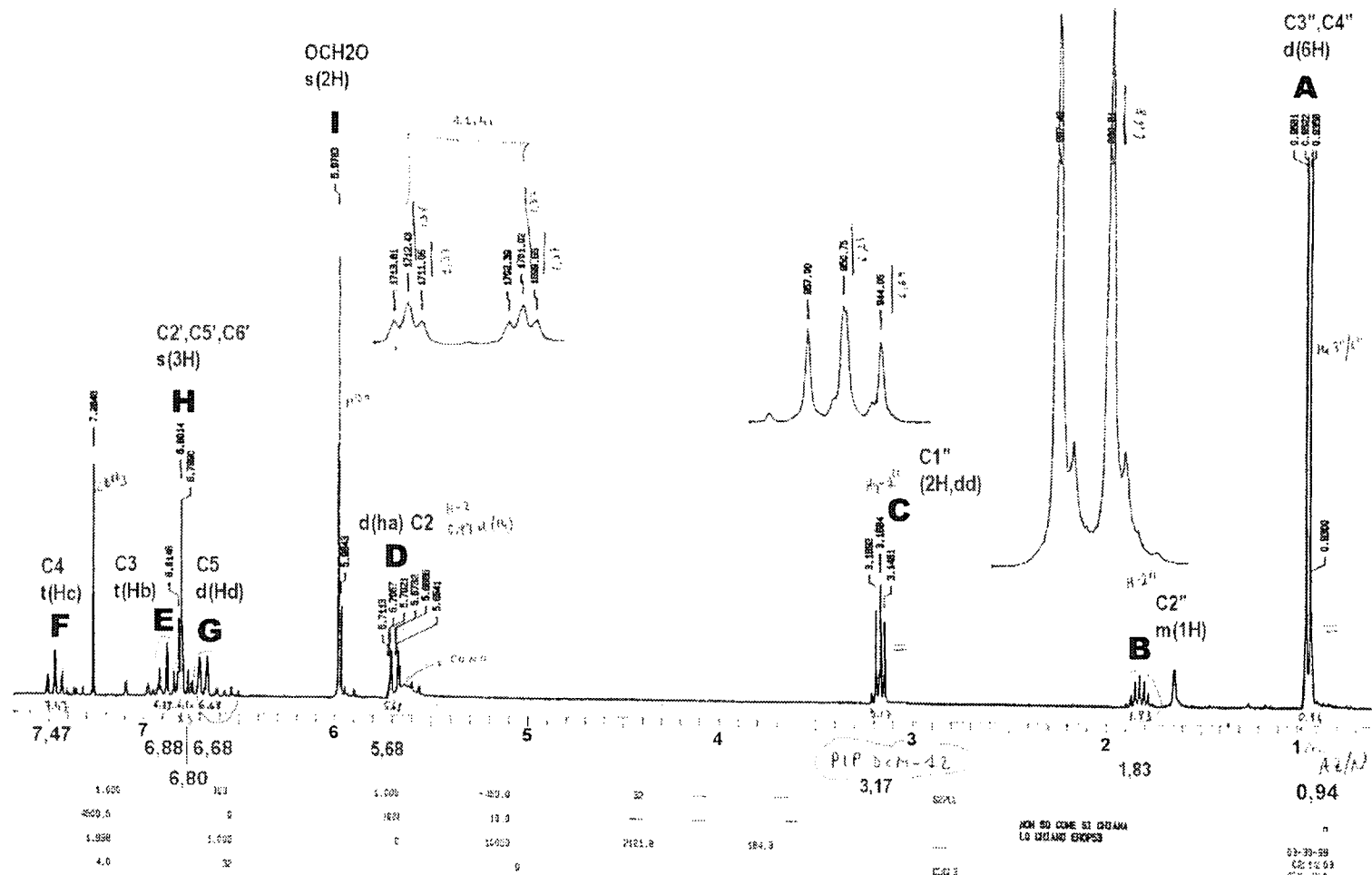
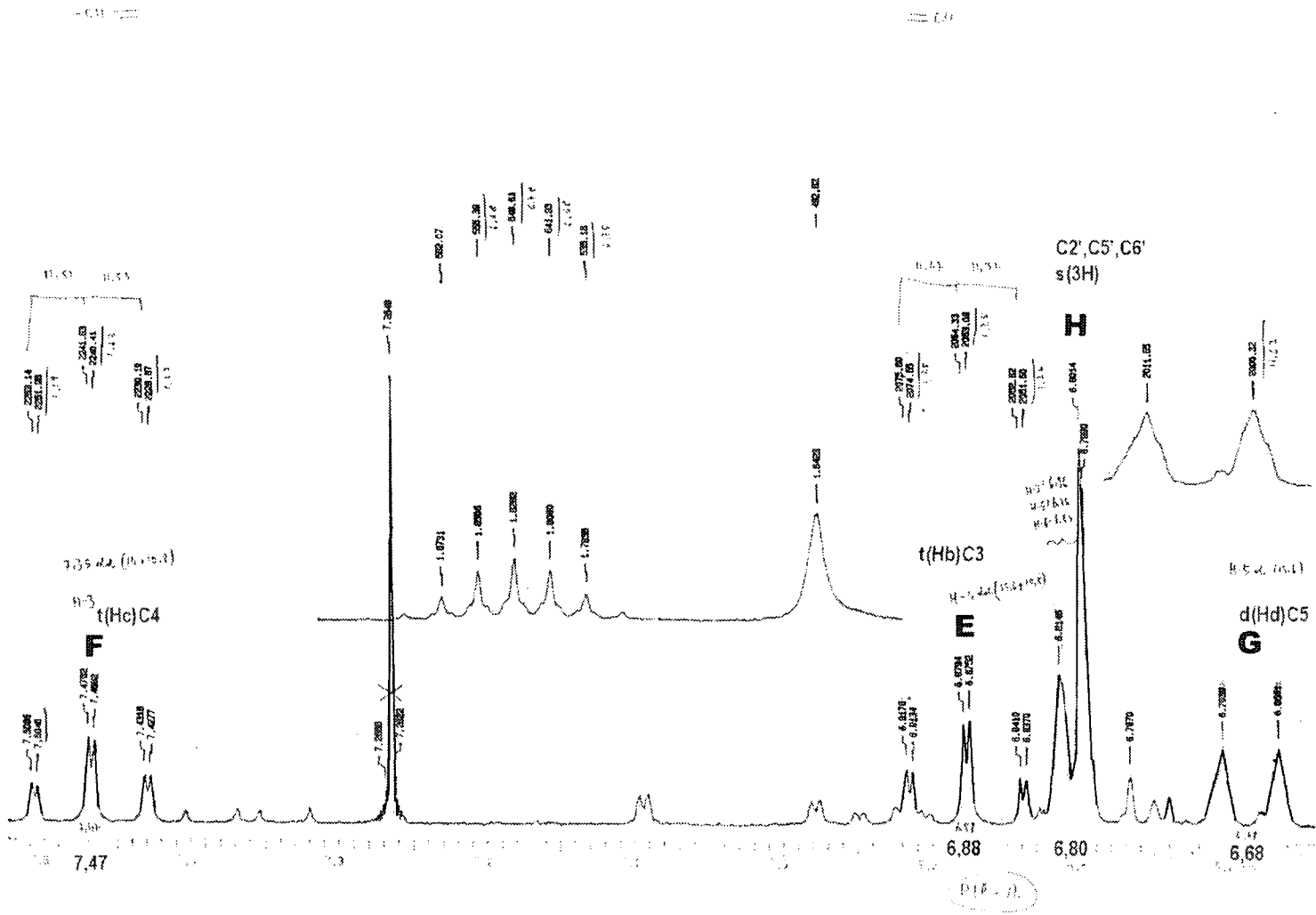


FIGURA 14B - ESPECTRO DE ^1H RMN - OMA 1



O espectro de ^{13}C RMN (fig. 15) apresentou os seguintes resultados:

- A. Um deslocamento químico a 20,1788 ppm, referente ao C_4'' .
- B. Um deslocamento químico a 20,1805 ppm, referente ao C_3'' .
- C. Um deslocamento químico a 28,6014 ppm, referente ao C_2'' .
- D. Um deslocamento químico a 46,7769 ppm, referente ao C_1'' .
- E. Um deslocamento químico a 166,310 ppm, referente ao C_1 .
- F. Um deslocamento químico a 123,625 ppm, referente ao C_2 .
- G. Um deslocamento químico a 136,272 ppm, referente ao C_3 .
- H. Um deslocamento químico a 122,221 ppm, referente ao C_4 .
- I. Um deslocamento químico a 135,688 ppm, referente ao C_5 .
- J. Um deslocamento químico a 130,733 ppm, referente ao C_1' .
- K. Um deslocamento químico a 105,700 ppm, referente ao C_2' .
- L. Um deslocamento químico a 148,200 ppm, referente ao C_3' .
- M. Um deslocamento químico a 148,200 ppm, referente ao C_4' .
- N. Um deslocamento químico a 108,100 ppm, referente ao C_5' .
- O. Um deslocamento químico a 124,895 ppm, referente ao C_6' .
- P. Um deslocamento químico a 101,300 ppm, referente ao carbono do grupo $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$

O aparelho de 70 MHz foi capaz de revelar a posição dos carbonos desta amida.

A estrutura química da Isopiperlonguminina foi consistente com o espectro ^{13}C RMN da substância OMA 1.

FIGURA 15A - ESPECTRO DE ^{13}C RMN - OMA 1

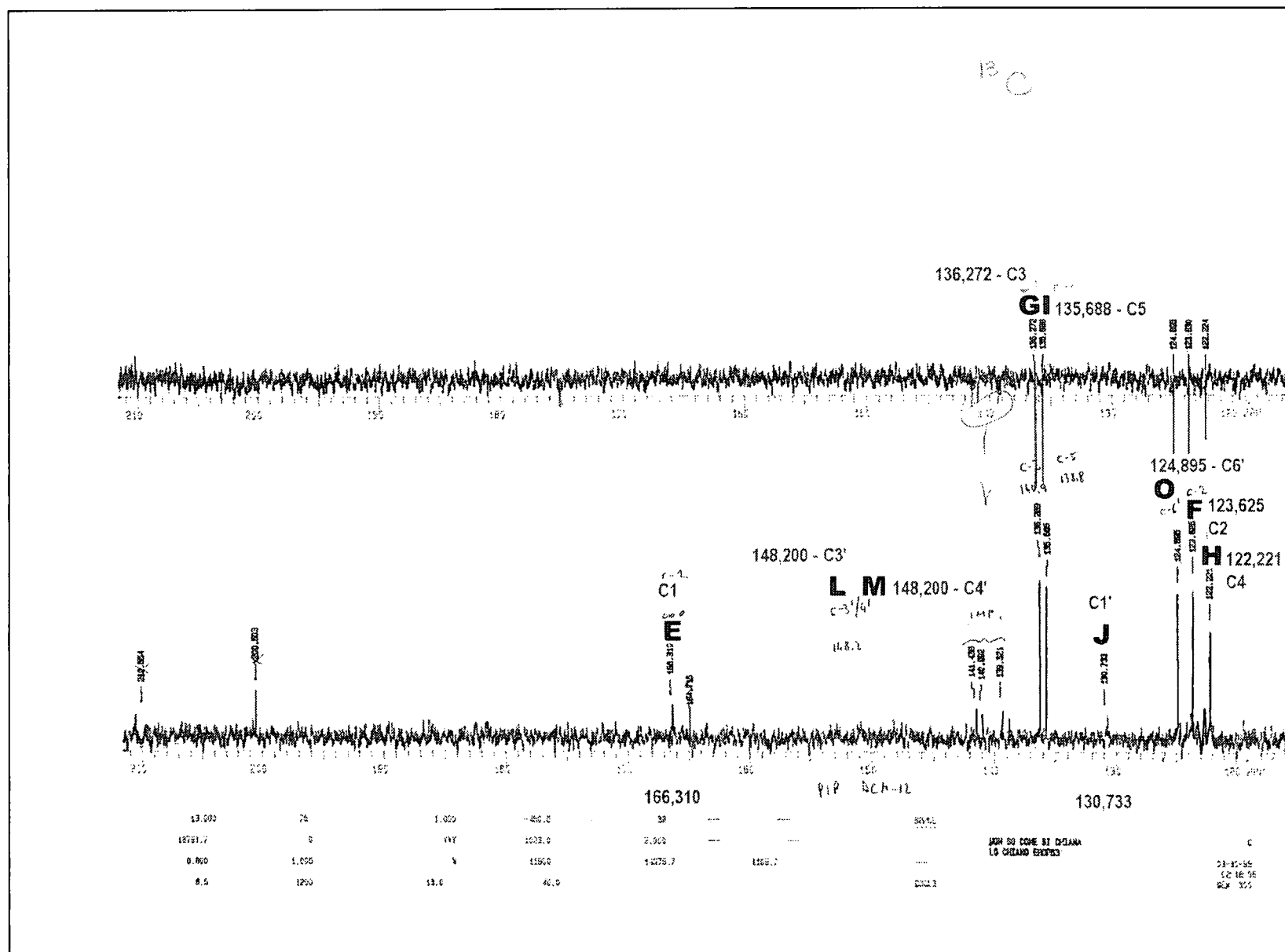
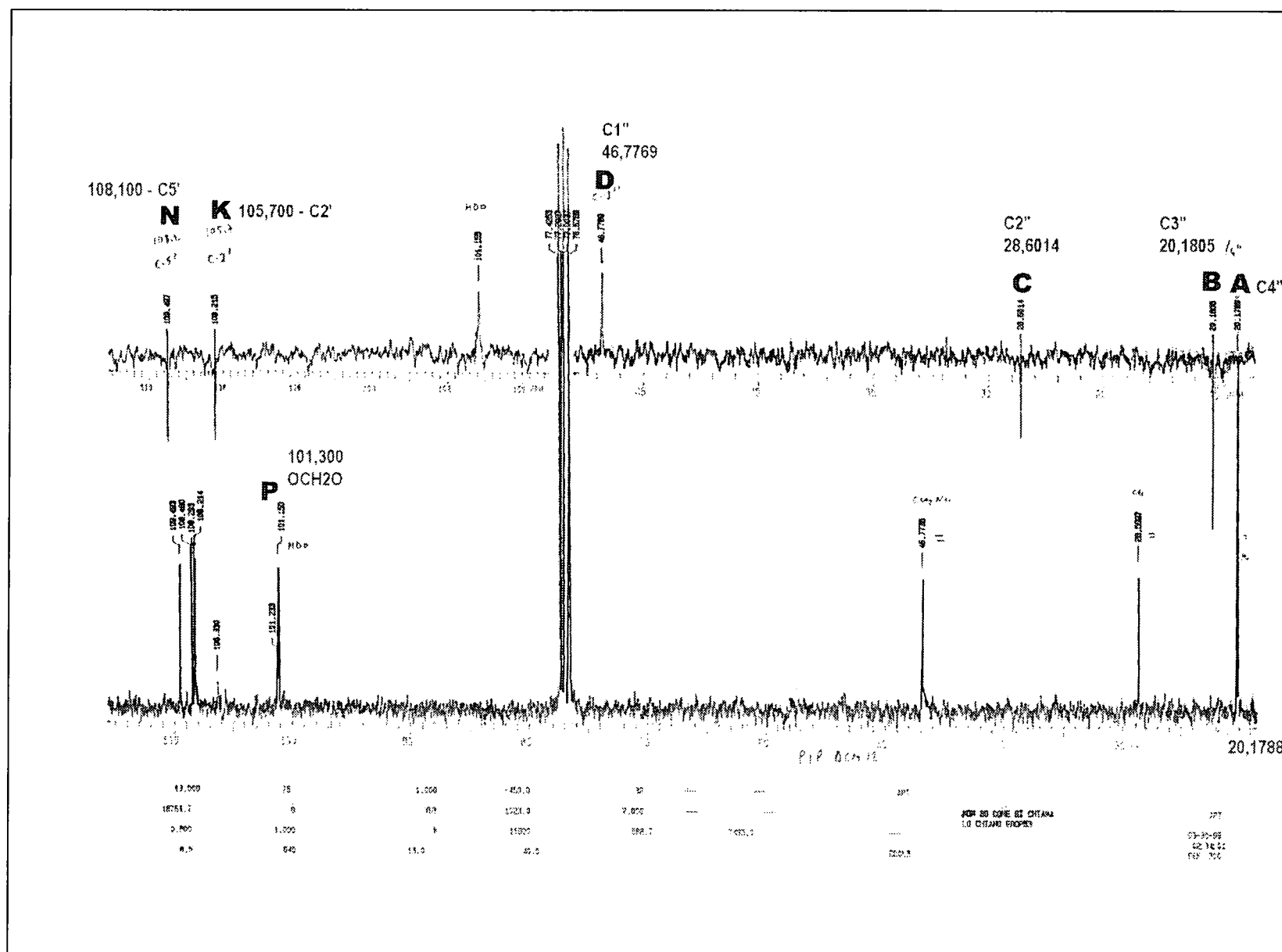


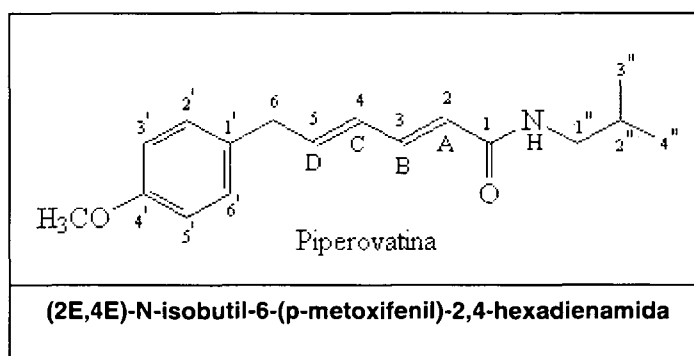
FIGURA 15B - ESPECTRO DE ^{13}C RMN - OMA 1



4.4.2 Determinação Estrutural da OMA 3

A análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto isolado OMA 3, juntamente com os dados de literatura, permitiram elucidar a identidade do mesmo, como sendo a substância Piperovatina (fig. 16), cuja estrutura foi confirmada pelos dados dos deslocamentos químicos dos seus carbonos.

FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DA OMA 3



O espectro de ^1H RMN (fig. 17) apresentou os seguintes resultados:

- A. Um dubleto a 0,92 ppm (6H, d) referente a um grupo isopropil de prótons do C_3'' e C_4'' .
- B. Um multipeto a 1,78 ppm (1H, m) referente ao próton de C_2'' .
- C. Um triplete a 3,16 ppm (2H, t, $J=6,79$) referente ao próton de C_1'' .
- D. Um dubleto a 5,79 ppm (1H, d, $J=15,11$ Hz), um multipeto entre 5,91 e 6,39 (3H, m, $J=8,72$) referente aos prótons olefínicos ligados a um sistema de dienos: C_5 , C_4 , C_3 , e C_2
- E. Um dubleto a 3,42 ppm (2H, d, $J=6,15$ Hz), referente a um grupo benzílico CH_2 , para os prótons do C_6 .
- F. Um dubleto a 6,84 ppm (2H, d, $J=8,69$), referente aos prótons dos C_3' e C_5' do anel benzênico.
- G. Um singlete a 3,79 ppm (3H, s, $J=5,44$ Hz), referente aos prótons de um grupo metoxila aromático ($\text{C}_4'\text{OCH}_3$).
- H. Um dubleto a 7,08 ppm (2H, d, $J=14,53$ Hz), referente aos prótons dos C_2' e C_6' do anel benzênico

O tripleto a 3,16 ppm (2H, t, $J=6,79$), o qual é especificado para um radical -NH-CH₂-CH agrupado, referentes aos prótons do C₁", deveria aparecer como um quarteto ($J_{CH-NH} = J_{CH-CH}$), porém, segundo PINDER e PRICE (1967), os dois sinais se sobrepõem, e estes sob deuteração vão para um dubleto centralizado a 3,12 ppm.

Os dados do espectro de ¹H RMN corroboram com aqueles do espectro de PINDER e PRICE (1967).

O aparelho de 400 MHz foi capaz de revelar a posição dos prótons da amida e as constantes de acoplamento do grupo metila, aromático e dos sistemas de dienos.

FIGURA 17A - ESPECTRO DE ^1H RMN - OMA 3

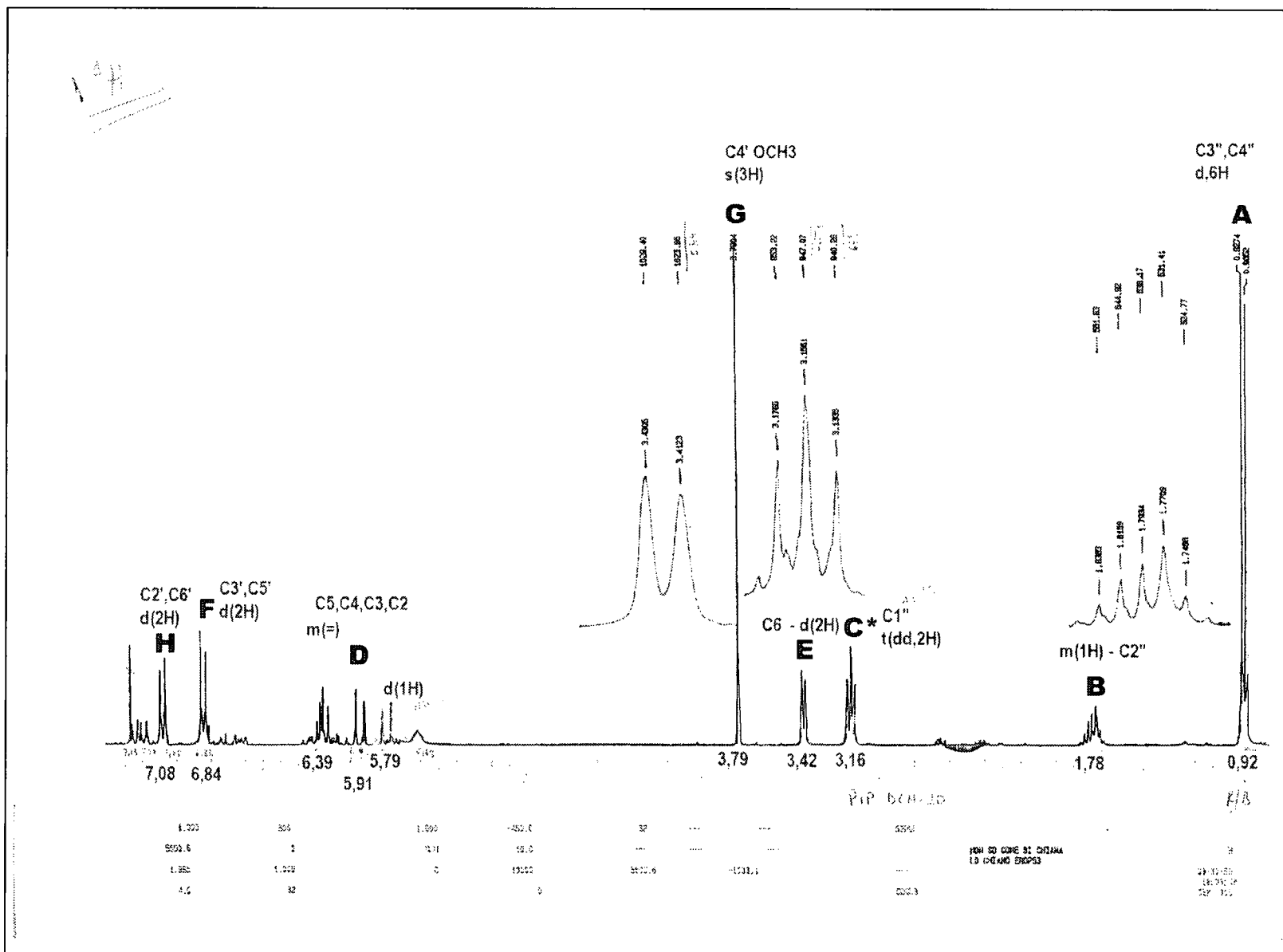
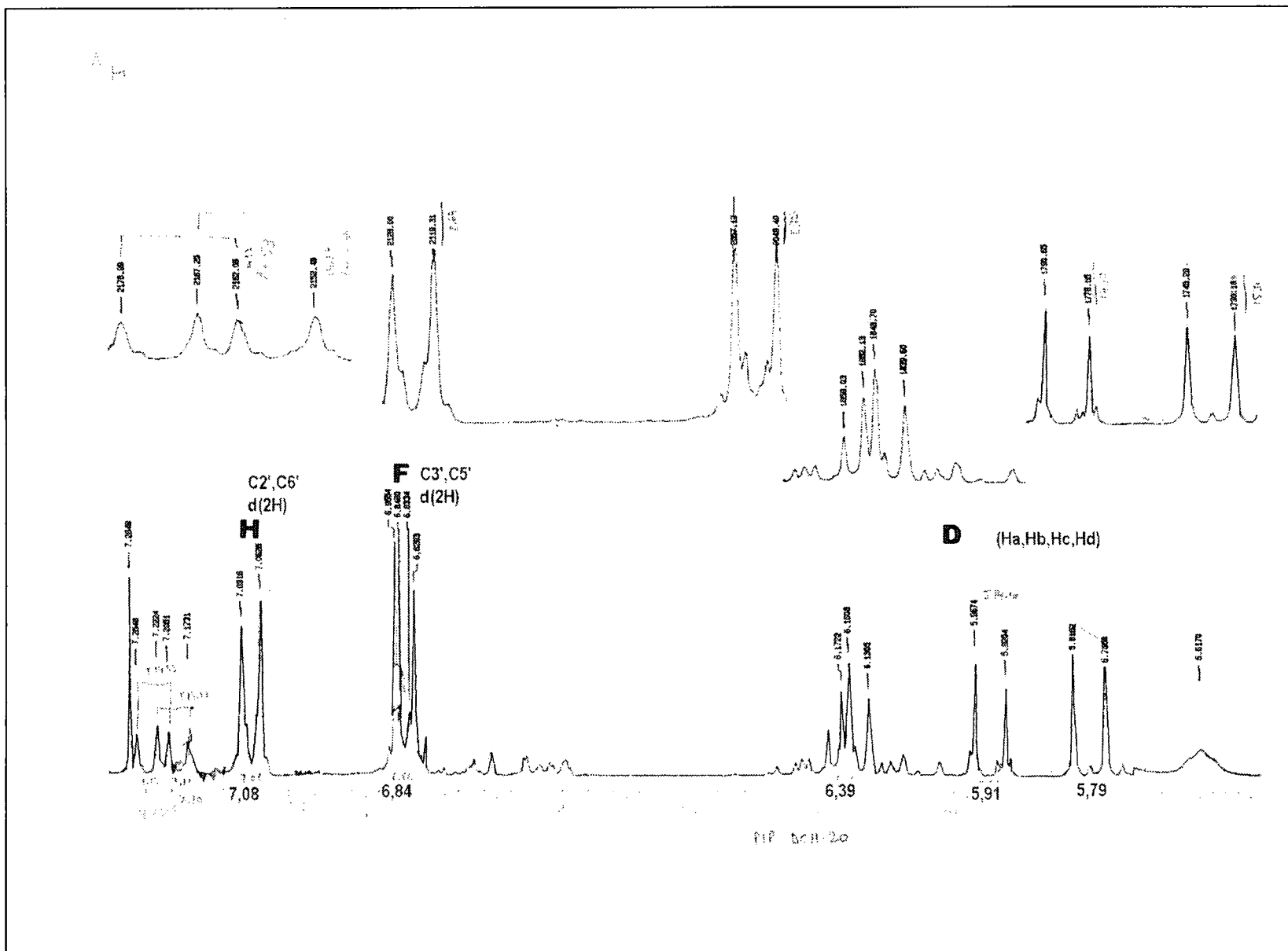


FIGURA 17B - ESPECTRO DE ^1H RMN - OMA 3



O espectro de ^{13}C RMN (fig. 18) apresentou os seguintes resultados:

- A. Um deslocamento químico a 20,0928 ppm, referente ao C_4^a (CH_3).
- B. Um deslocamento químico a 20,0928 ppm, referente ao C_3^a (CH_3).
- C. Um deslocamento químico a 28,5964 ppm, referente ao C_2^a (CH).
- D. Um deslocamento químico a 46,9135 ppm, referente ao C_1^a ($\text{CH}_2\text{-NH}$).
- E. Um deslocamento químico a 166,185 ppm, referente ao C_1 (CO).
- F. Um deslocamento químico a 122,685 ppm, referente ao C_2 ($=\text{C-}$).
- G. Um deslocamento químico a 140,921 ppm, referente ao C_3 ($-\text{C=}$).
- H. Um deslocamento químico a 129,030 ppm, referente ao C_4 ($=\text{C-}$).
- I. Um deslocamento químico a 141,428 ppm, referente ao C_5 (C-CH=).
- J. Um deslocamento químico a 38,2498 ppm, referente ao C_6 (CH_2).
- K. Um deslocamento químico a 131,083 ppm, referente ao C_1^b (C-CH_2).
- L. Um deslocamento químico a 129,571 ppm, referente ao C_2^b ($=\text{CH-}$).
- M. Um deslocamento químico a 113,958 ppm, referente ao C_3^b ($-\text{CH=}$).
- N. Um deslocamento químico a 158,160 ppm, referente ao C_4^b (C=OCH_3).
- O. Um deslocamento químico a 113,958 ppm, referente ao C_5^b ($-\text{CH=}$).
- P. Um deslocamento químico a 129,571 ppm, referente ao C_6^b ($=\text{CH-}$).
- Q. Um deslocamento químico a 55,2552 ppm, referente ao carbono do grupamento O-C_H_3 .

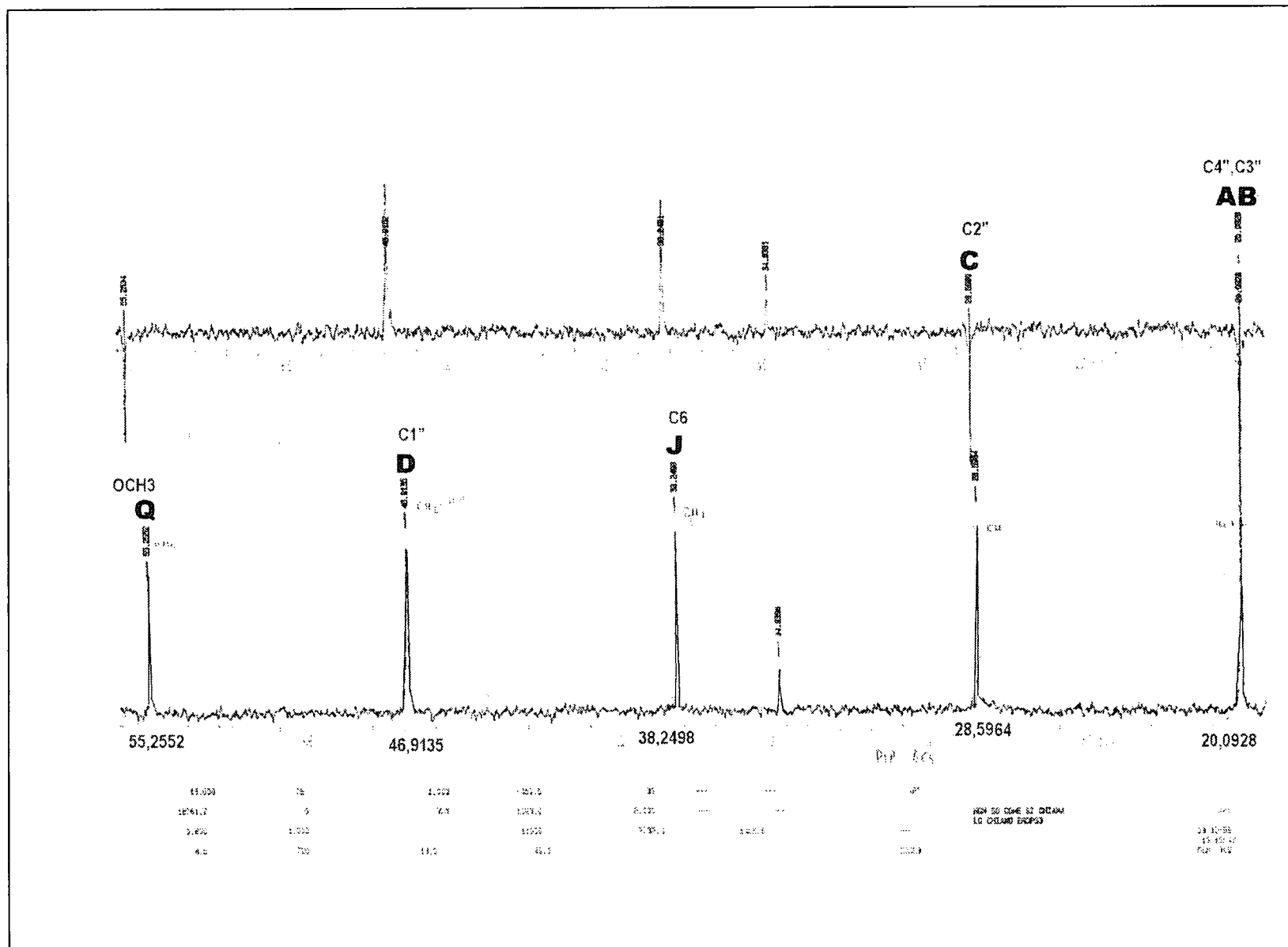
A estrutura química da Piperovatina é consistente com o espectro ^{13}C RMN da substância OMA 3.

O espectro da Piperovatina apresenta na região de campo baixo, a carbonila da amida (166,185 ppm) e insaturação α - β , γ - δ (122,685-140,921, 129,571-141,428 ppm).

Foram observadas absorções características de anel aromático p substituído (131,083; 129,571; 113,958; 158,160 ppm).

O espectro apresenta na região de campo alto absorções características da porção isobutílica (20,0928; 28,5964; 46,9135 ppm) e de benzil (38,2498 ppm).

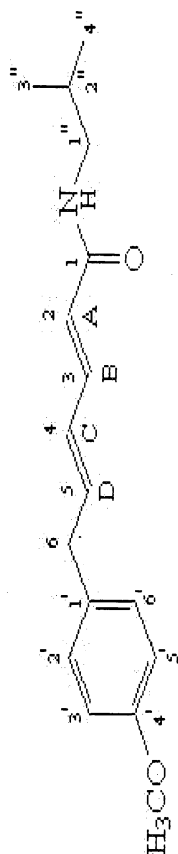
FIGURA 18B - ESPECTRO DE ^{13}C RMN - OMA 3



Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto OMA 3 encontram-se inseridos na tabela 7.

TABELA 7 - DADOS DE ^{13}C RMN (70 MHz, CDCl_3) e ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO ISOLADO OMA 3

Dados Espectroscópicos do Composto OMA 3				Piperovatina, dados segundo MACFERREN e RODRIGUEZ (1998, p. 185)		
Carbono e NH	^{13}C RMN δ (ppm)	^1H RMN δ (ppm)	Multiplicidade (J em Hz)	^{13}C RMN δ (ppm)	^1H RMN δ (ppm)	Multiplicidade (J em Hz)
C4"	20,0928	0,92	d (3H)	20,30	0,90	d (3H - J = 6,7)
C3"	20,0928	0,92	d (3H)	20,30	0,90	d (3H - J = 6,7)
C2"	28,5964	1,78	m (1H)	28,78	1,78	m (1H - J = 6,7)
C1"	46,9135	3,16	dd (2H, t - J=6,79)	47,10	3,13	t (2H - J = 6,4)
NH, br.	-	5,62	d	-	5,87	bs
C1	166,1850	-	-	166,43	-	-
C2	122,6850	5,79	d (H_A - J = 15,11)	122,93	5,81	d (H_A , J = 14,9)
C3	140,9210	5,91-6,3	m (H_B - J = 8,72)	141,21	7,19	dd (H_B , J=14,9)
C4	129,0300	5,91-6,3	m (H_C - J = 8,72)	129,23	6,08-6,2	m (H_C)
C5	141,4280	5,91-6,3	m (H_D - J = 8,72)	140,81	6,08-6,2	m (H_D)
C6	38,2498	3,42	d (2H, d, J=6,15)	38,43	3,40	d (2H, J = 5,49)
C1'	131,083	-	-	131,26	-	-
C2'	129,571	7,08	d (1H, J = 14,53)	129,70	7,06	d (1H, J = 8,54)
C3'	113,958	6,84	d (1H, J = 8,69)	114,12	6,83	d (1H, J = 8,24)
C4'	158,160	-	-	158,30	-	-
C5'	113,958	6,84	d (1H, J = 8,69)	114,12	6,83	d (1H, J = 8,24)
C6'	129,5710	7,08	d (1H, J = 14,53)	129,70	7,06	d (1H, J = 8,54)
O-CH ₃	55,2552	3,79	s (3H, J = 5,44)	55,44	3,77	s (3H)



4.5 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DOS FRUTOS DA *O. martiana* OBTIDOS PELO EQUIPAMENTO PORTÁTIL EXTRATOR PARA OPERAÇÕES COM GASES LIQÜEFEITOS (OLIVEIRA, 1998)

Frutos em pó (4,98 g) de *O. martiana* foram submetidos à cinco extrações, utilizando-se um Equipamento Portátil Extrator para Operações com Gases Liqüefeitos.

Os rendimentos desta extração encontram-se representados na tabela 8 abaixo.

TABELA 8 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DA *O. martiana*

Extração dos Frutos em pó (4,98 g)	Massa de GLP utilizada (g)	Tempo (h)	Rendimento (g)
1ª Extração (E1)	13,5	2	0,4102
2ª Extração (E2)	12,8	4	0,2695
3ª Extração (E3)	10,5	2	0,2340
4ª Extração (E4)	10,9	3	0,2255
5ª Extração (E5)	11,5	24	0,1744

GLP:COLIBRI (BUTANE LIGHTER GAS EXTRA PURIFIED)

Os extratos foram monitorados por CCD, o que resultou na análise dos extratos da 1ª, 3ª e 5ª extração por CG, e da 1ª e 5ª extração por meio de CG-MS, além da comparação com amostras autênticas.

4.5.1 Identificação de Substâncias Presentes nos Extratos Analisados

A análise do extrato E1 por CG e comparação com amostras autênticas evidenciou a presença de dois esteróides em alta concentração (estigmasterol e β -sitosterol), os quais também foram evidenciados no E3, porém em baixa concentração, cujos cromatogramas encontram-se inseridos nas figuras 19 a 21 deste trabalho.

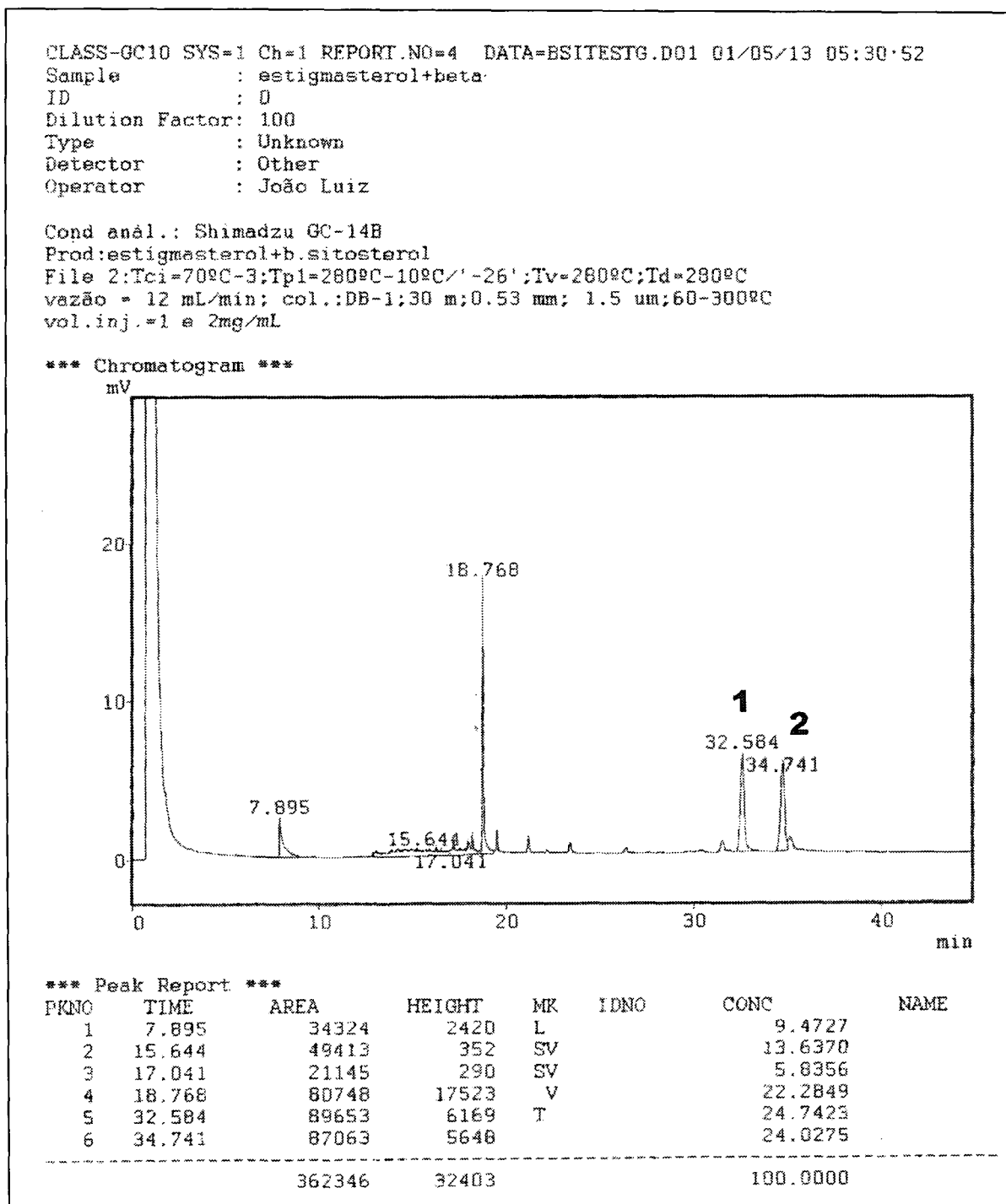
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA (CG) DOS PADRÕES: ESTIGMASTEROL (1) e β SITOSTEROL (2)

FIGURA 20 - CROMATOGRAMAS (CG):

A - E1

B - E3

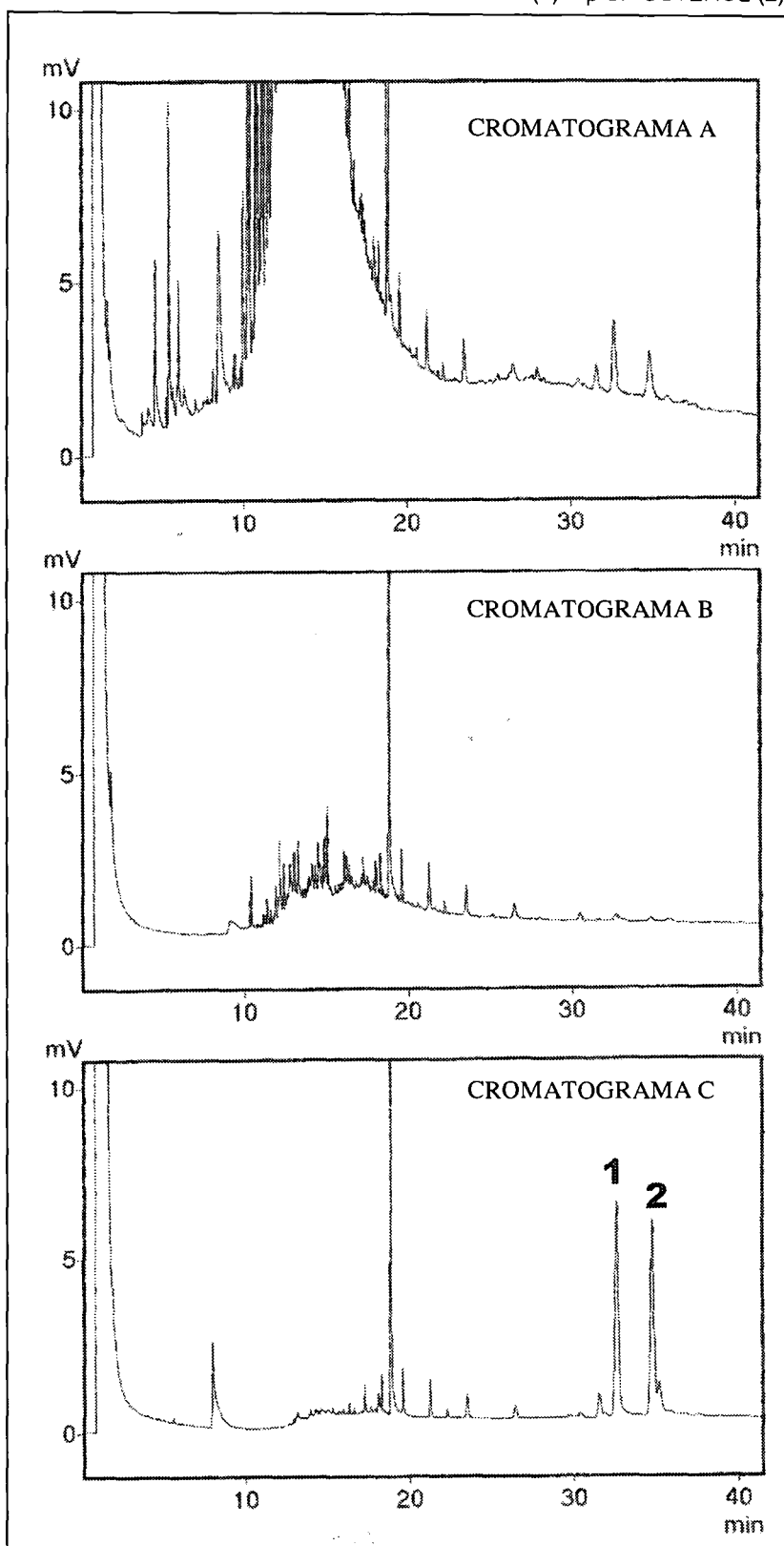
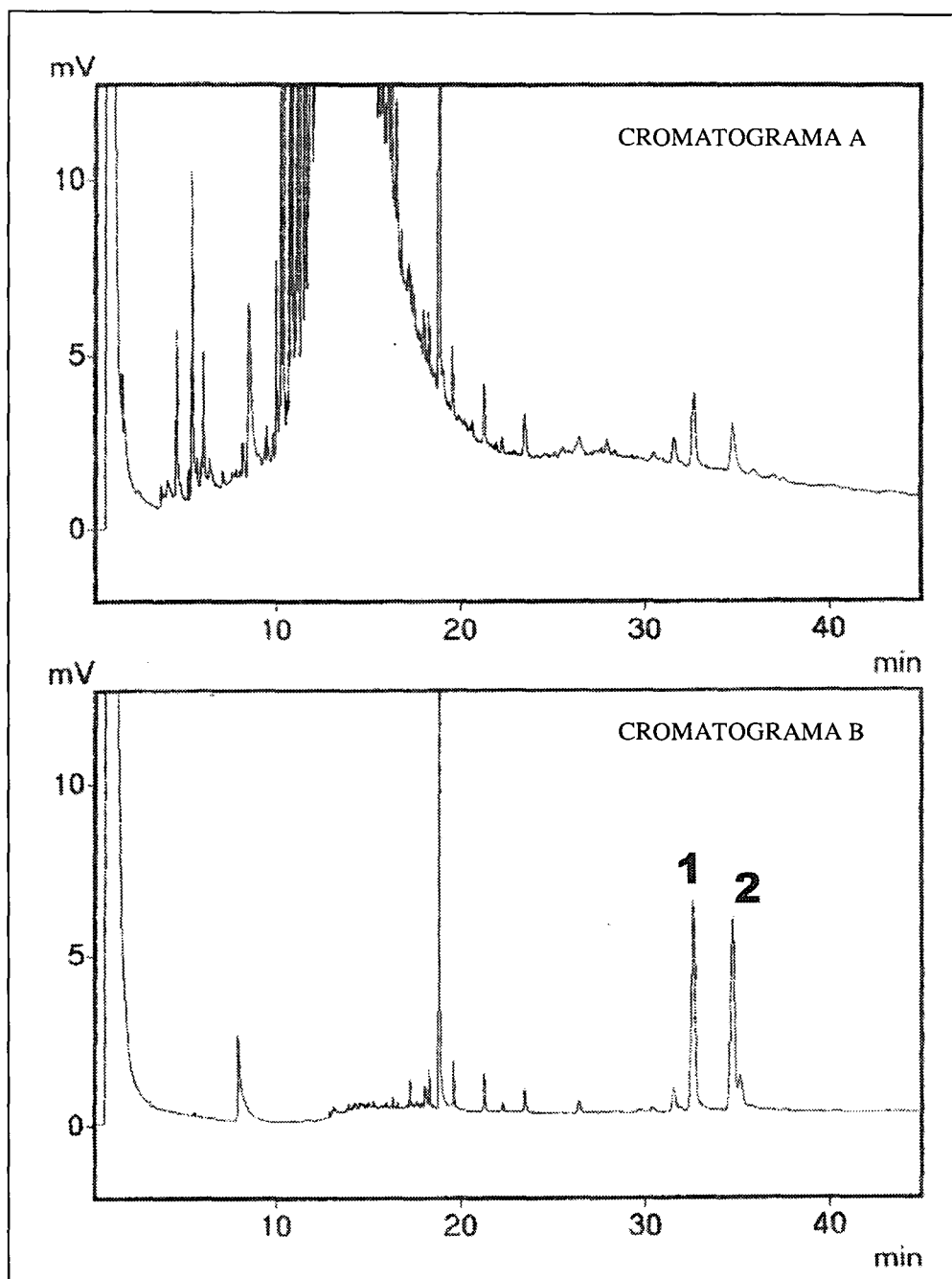
C - PADRÕES: ESTIGMASTEROL (1) e β SITOSTEROL (2)

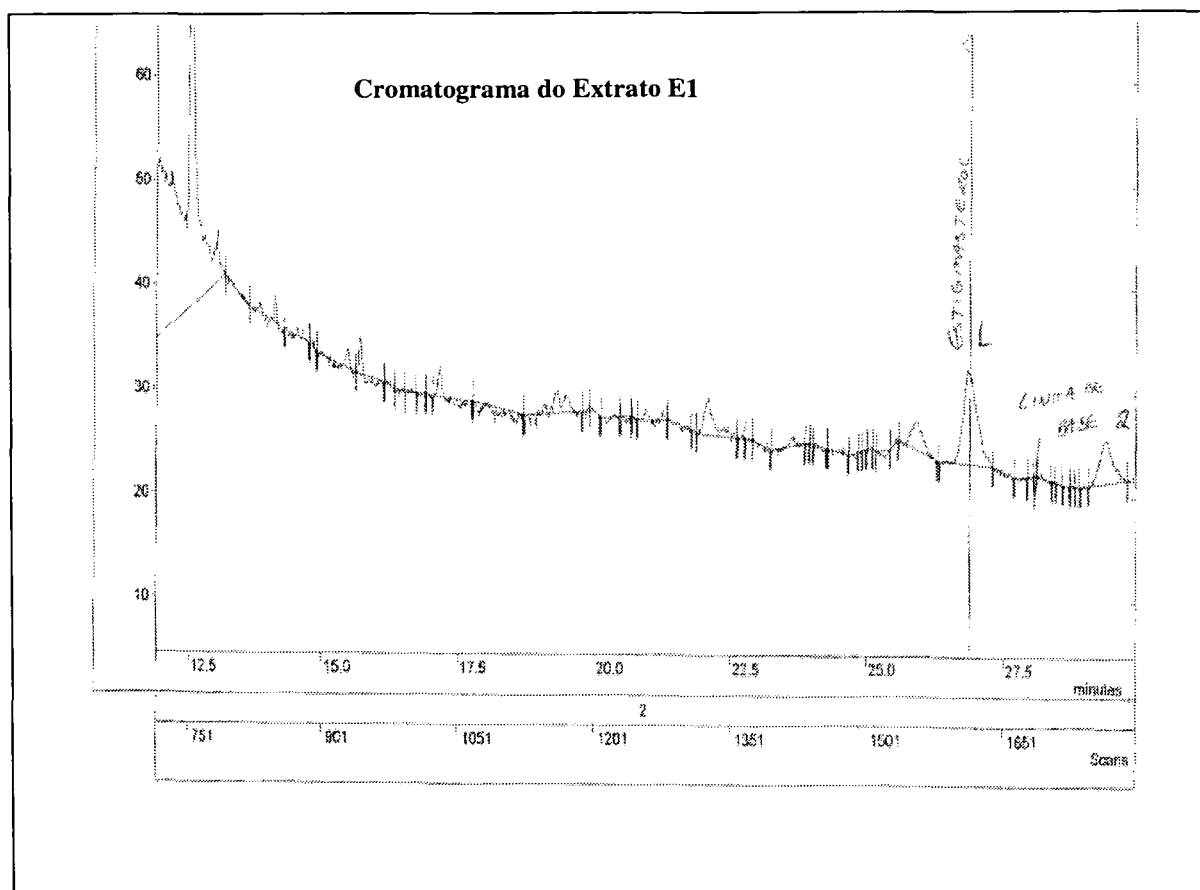
FIGURA 21 - CROMATOGRAMAS (CG)

A - E1

B - E1 + PADRÕES: ESTIGMASTEROL (1) e β SITOSTEROL (2)

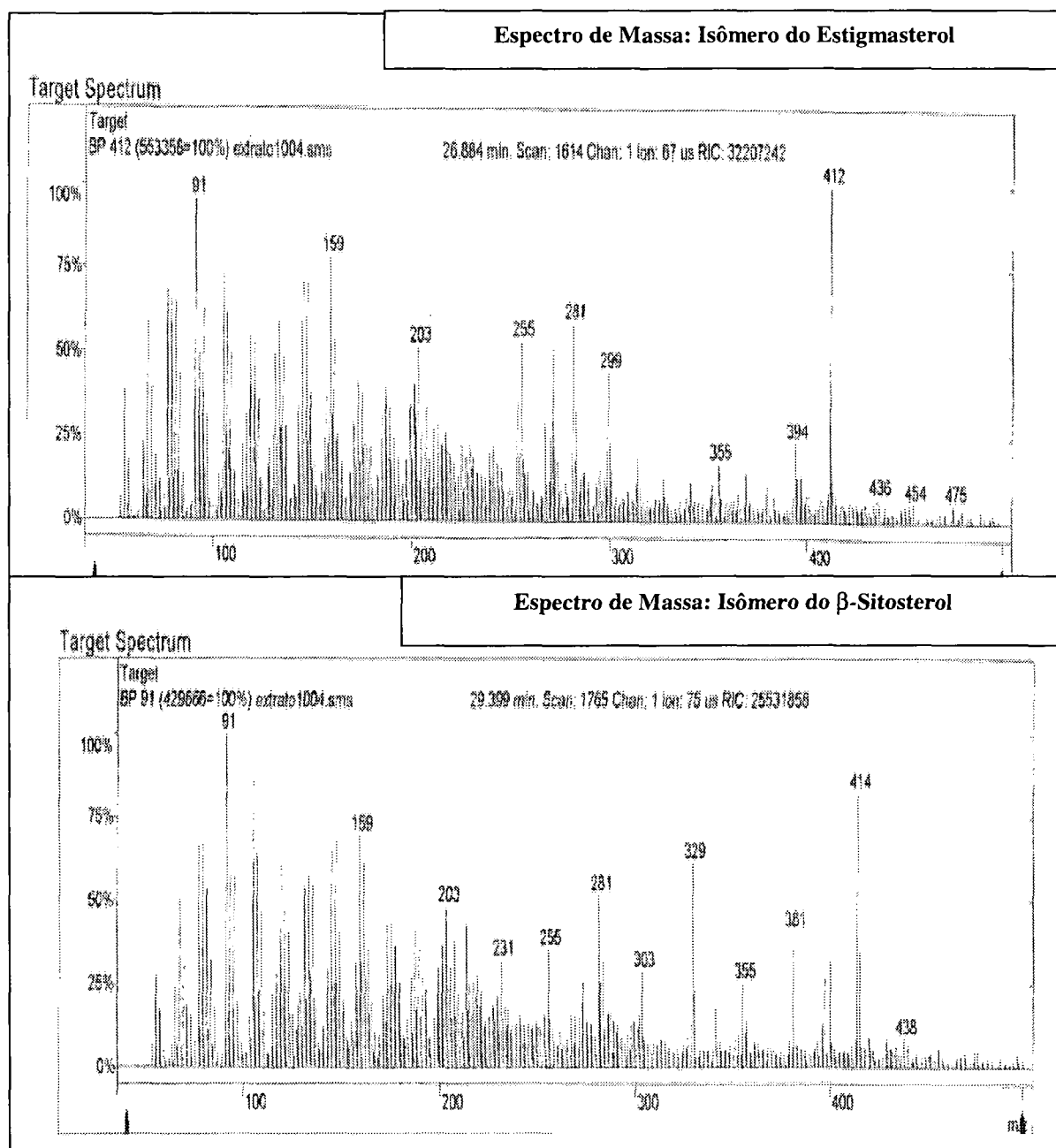
Entretanto, quando o extrato E1 foi analisado por CG-MS (fig. 22), os espectros de massa sugeriram que estas substâncias são isômeros dos compostos estigmasterol e β -sitosterol (fig. 23).

FIGURA 22 - DADOS DA ANÁLISE POR CG-MS DO EXTRATO E1 DOS FRUTOS DA *O. martiana*



Cond. anál.: VARIAN GC-MS
 Coluna VA-5 (5% fenil/ 95% metil)
 Comprimento: 30 m
 Diâmetro: 0,25 mm
 T_{\min} : - 60°C
 T_{\max} : 325°C
 T_{ci} = 100°C - 5'; T_{p1} = 240°C - 20°C/ 48'
 Fluxo: 1 mL/min.
 V_{injetado} : 20 μ L

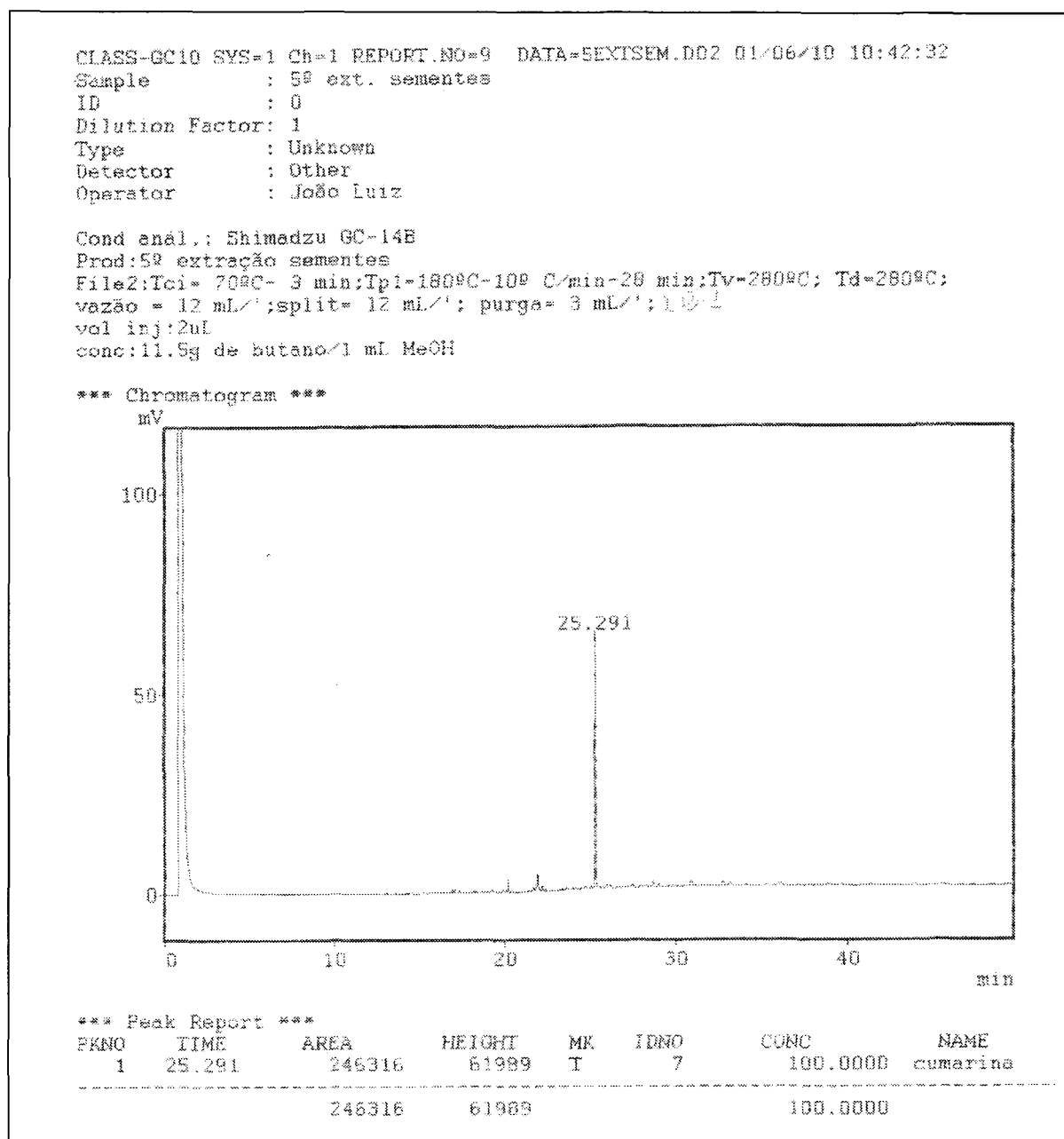
FIGURA 23 - ESPECTROS DE MASSA



Cond. anál.: VARIAN GC-MS
 Coluna VA-5 (5% fenil/ 95% metil)
 Comprimento: 30 m
 Diâmetro: 0,25 mm
 T_{\min} : - 60°C
 T_{\max} : 325°C
 T_{ci} = 100°C - 5'; T_{p1} = 240°C - 20°C/ 48'
 Fluxo: 1 mL/min.
 V_{injetado} : 20 μ L

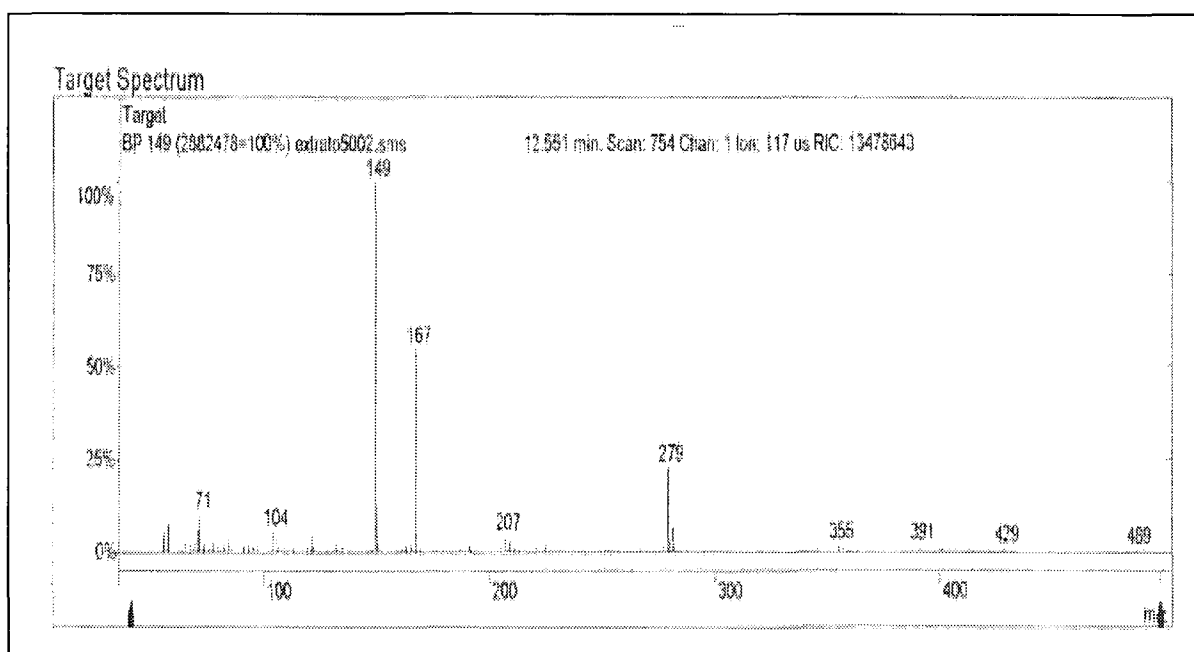
No extrato E5, outra substância quase pura é evidenciada no cromatograma que está inserido na figura 24.

FIGURA 24 - CROMATOGRAMA (CG) DO E5



O espectro de massa da substância anteriormente evidenciada apresenta fragmentos característicos do composto Bis(2-etilhexil)ftalato (fig. 25), composto plastificante que poderia estar presente na mangueira da válvula do spray do GLP, solvente utilizado na extração.

FIGURA 25 - DADOS DA ANÁLISE DO EXTRATO E5 DOS FRUTOS DE *O. martiana* POR CG-MS:
ESPECTRO DE MASSA CARACTERÍSTICO DO BIS (2-ETILHEXIL) FTALATO



Cond. anál.: VARIAN GC-MS
Coluna VA-5 (5% fenil/ 95% metil)
Comprimento: 30 m
Diâmetro: 0,25 mm
T_{min}: - 60°C
T_{máx}: 325°C
T_{ci} = 100°C - 5'; T_{p1} = 240°C - 20°C/ 48'
Fluxo: 1 mL/min.
V_{injetado}: 20 µL

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DA *O. martiana*

Verificou-se um clareamento ao redor dos discos impregnados com o EBEtOH dos Caules e das Raízes (fig.26), nas concentrações de 50 e 100%, em tratamentos com *S. aureus*, evidenciando-se uma atividade antibacteriana, devido à presença de um pequeno halo de inibição de crescimento bacteriano (tab. 9).

Para amostras testadas com *S. epidermidis* e *E. coli*, nenhum halo de inibição foi observado (tab. 9), indicando que os EBEtOH de *O. martiana*, nas concentrações testadas, não apresentam atividade antibacteriana para estes patógenos.

TABELA 9 - RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

			Halos de Inibição dos Patógenos Testados em milímetros (mm)		
Amostra testada	Concentração do EBEtOH incorporados aos discos de papel	Massa (mg) do EBEtOH em 20µL	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>E. coli</i> ATCC 8739
EBEtOH das Raízes (1)	100,0%	0,4100	2,5	0,0	0,0
	50,0%	0,2050	2,0	0,0	0,0
	25,0%	0,1025	0,0	0,0	0,0
	12,5%	0,0512	0,0	0,0	0,0
EBEtOH dos Caules (2)	100,0%	4,4520	5,0	0,0	0,0
	50,0%	2,2260	2,5	0,0	0,0
	25,0%	1,1130	0,0	0,0	0,0
	12,5%	0,5565	0,0	0,0	0,0
Controle Cloranfenicol (1) / (2)		0,0300 (30 µg)	21/22	25/25	18/13
Controle de crescimento			+	+	+

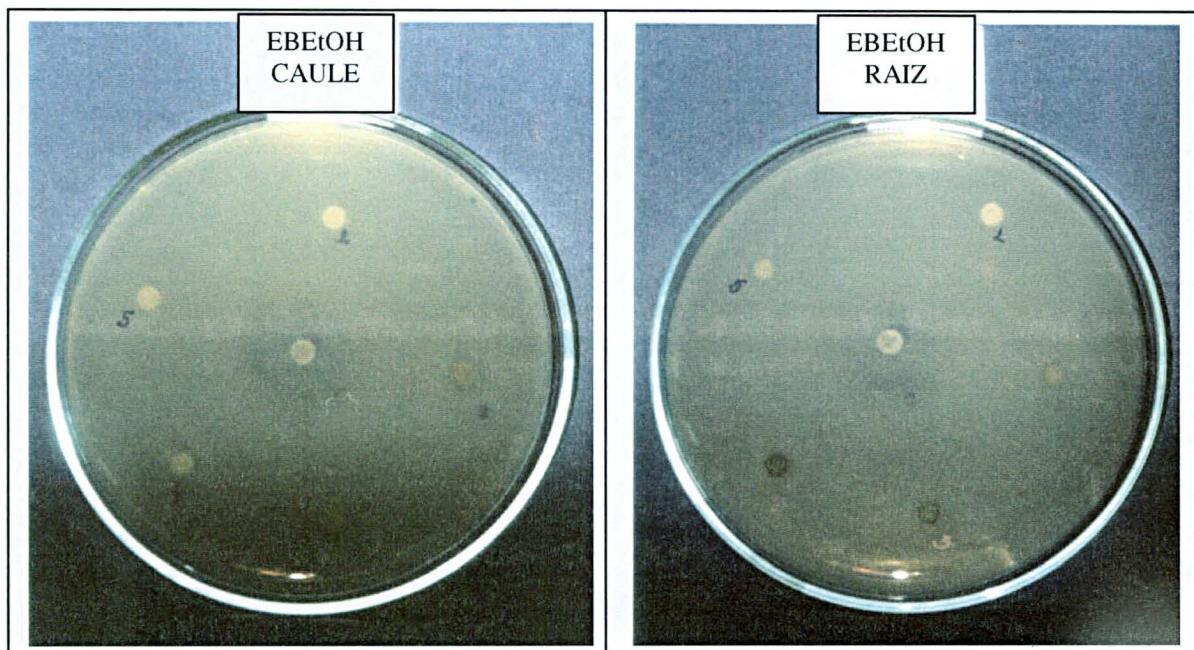
+ CONTROLE POSITIVO DE CRESCIMENTO

FIGURA 26 - ESPECTRO DE SENSIBILIDADE DO ISOLADO *S. aureus* NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EBEtOH (CAULE E RAÍZES) DA *O. martiana*:

1 - Etanol - controle do solvente / 2 - EBEtOH Puro - 100%

3 - EBEtOH - 50% / 4 - EBEtOH - 25%

5 - EBEtOH - 12,5% / 6 - Cloranfenicol



FOTOGRAFIA DO ESPECTRO DE SENSIBILIDADE DE UM ISOLADO (DEISE MONTRUCCHIO, 2001)

Como inicialmente partiu-se de 198,95 g de raízes da planta, ensaios biológicos com as substâncias isoladas e identificadas foram inviabilizados, levando à utilização de extratos de outros órgãos vegetais disponíveis.

Estudo similar foi realizado com extrato bruto das raízes de *Salvia viridis* por ULUBELEN et al. (2000), os quais evidenciaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Proteus mirabilis*.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E AQUOSOS DA *O. martiana*

Comparando-se o crescimento micelial dos isolados dos patógenos testados nos meios de cultura contendo extratos brutos etanólicos (raízes e caules estabilizados) e aquosos (folhas frescas) com o tratamento controle verificou-se uma atividade antifúngica dependente do método de extração e diretamente proporcional à quantidade de extrato no meio de cultura.

Os melhores resultados foram obtidos com o extrato etanólico das raízes, nas concentrações de 50, 25 e 12,5%, causando inibição do crescimento dos três patógenos em valores acima de 50% (tab. 10).

O extrato bruto aquoso das folhas frescas apresentou melhores resultados na inibição do crescimento da *Rhizoctonia* sp., ao contrário dos resultados com os outros patógenos estudados.

TABELA 10 - ATIVIDADE FUNGITÓXICA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS (CAULES E RAÍZES) E AQUOSOS (FOLHAS FRESCAS) DE *O. martiana*, NO CRESCIMENTO DE TRÊS PATÓGENOS

AMOSTRA	Concentração do extrato em BDA	<i>Fusarium oxysporum</i> (% de inibição)	<i>Colletotrichum acutatum</i> (% de inibição)	<i>Rhizoctonia</i> sp. (% de inibição)
EBEtOH (raízes)	50,0% = 102,2 mg	62,30	70,37	72,22
	25,0% = 51,1 mg	55,74	66,67	70,83
	12,5% = 25,5 mg	55,74	53,70	66,67
EBEtOH (caules)	50,0% = 1335,0 mg	55,74	50,00	63,89
	25,0% = 667,8 mg	47,54	44,45	62,50
	12,5% = 333,9 mg	40,98	31,48	62,50
EBaquoso (folhas frescas)	50,0% = 810,0 mg	3,33	8,33	76,92
	25,0% = 405,0 mg	0,00	4,17	61,54
	12,5% = 202,5 mg	0,00	2,08	15,39

Como utilizou-se extratos etanólicos neste ensaio, fez-se necessário a análise do teor alcoólico dos mesmos, uma vez que o tratamento controle (Testemunha) continha apenas o meio BDA. Para tal, utilizou-se o método da microdestilação. O teor alcoólico da solução de extratos utilizados neste experimento foi desprezível, na ordem de 0,0075% para o EBEtOH das Raízes e 0,009% para o EBEtOH dos Caules.

Além disso, para confirmar que os fungos presentes na mesma placa não sofreram antagonismo, realizou-se um teste, onde os inóculos dos três patógenos em estudo foram colocados juntos e isoladamente em meio BDA, sem extratos vegetais. Quando comparados, não apresentaram diferenças significativas quanto ao raio das colônias (tab. 11).

Uma idéia dos resultados deste ensaio pode ser tomada com base nas placas controle das figuras 27 e 28.

TABELA 11 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS (CAULES E RAÍZES) E AQUOSOS (FOLHAS FRESCAS) DE *O. martiana*, SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DOS PATÓGENOS TESTADOS

AMOSTRA	Concentração do EB em BDA	Média dos Haicos de Crescimento Micelial dos isolados (mm)					
		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Colletotrichum acutatum</i>		<i>Rhizoctonia sp.</i>	
		EB	Controle A/B	EB	Controle A/B	EB	Controle A/B
EBEtOH (raízes)	50,0% = 102,2 mg	2,3 a*		1,6 a*		2,0 a*	
	25,0% = 51,1 mg	2,7 a*	6,1 b / 6,0 b	1,8 a	5,4 (bc) / 5,5 (bc)	2,1 a*	7,2 c / 7,0 c
	12,5% = 25,5 mg	2,7 a*	*	2,5 a(bc)*	*	2,4 a*	*
EBEtOH (caules)	50,0% = 1335,0 mg	2,7 d*		2,7 d(bc)*-*		2,6 d*	
	25,0% = 667,8 mg	3,2 db*	6,1 b / 6,0 b	3,0 d(bc)*	5,4 (bc) / 5,5 (bc)	2,7 d*	7,2 c / 7,0 c
	12,5% = 333,9 mg	3,6 db*-*	*	3,7 d(bc)*	*	2,7 d*	*
EBAquoso (folhas frescas)	50,0% = 810,0 mg	5,8 eb		4,4 eb -*		1,5 f	
	25,0% = 405,0 mg	6,2 eb	6,0 b / 6,0 b	4,7 eb*	4,8 b / 5,5 b	5,8 e(bc)	6,5 (bc) / 7,0 (bc)
	12,5% = 202,5 mg	6,1 eb -*	*	4,7 efb*	*	2,9 f(bc)*	*

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey - 5%) - média de 6 repetições casualizadas

Controle A: controle com inóculos dos patógenos colocados juntos na mesma placa de Petri em meio BDA

Controle B: controle com inóculos dos patógenos colocados isoladamente nas placas de Petri em meio BDA

* Não diferem estatisticamente dos outros EB testados para o mesmo patógeno, na mesma concentração

- Não difere estatisticamente dos outros EB testados para o mesmo patógeno, na mesma concentração, entretanto, estes outros EB diferem estatisticamente entre si na mesma concentração.

FIGURA 27 - FOTOGRAFIAS DAS COLÔNIAS DOS PATÓGENOS TESTADOS:

- 1 - *Fusarium oxysporum* (café) / 2 - *Colletotrichum acutatum* (morango)
 3 - *Rhizoctonia* sp. (erva-mate)

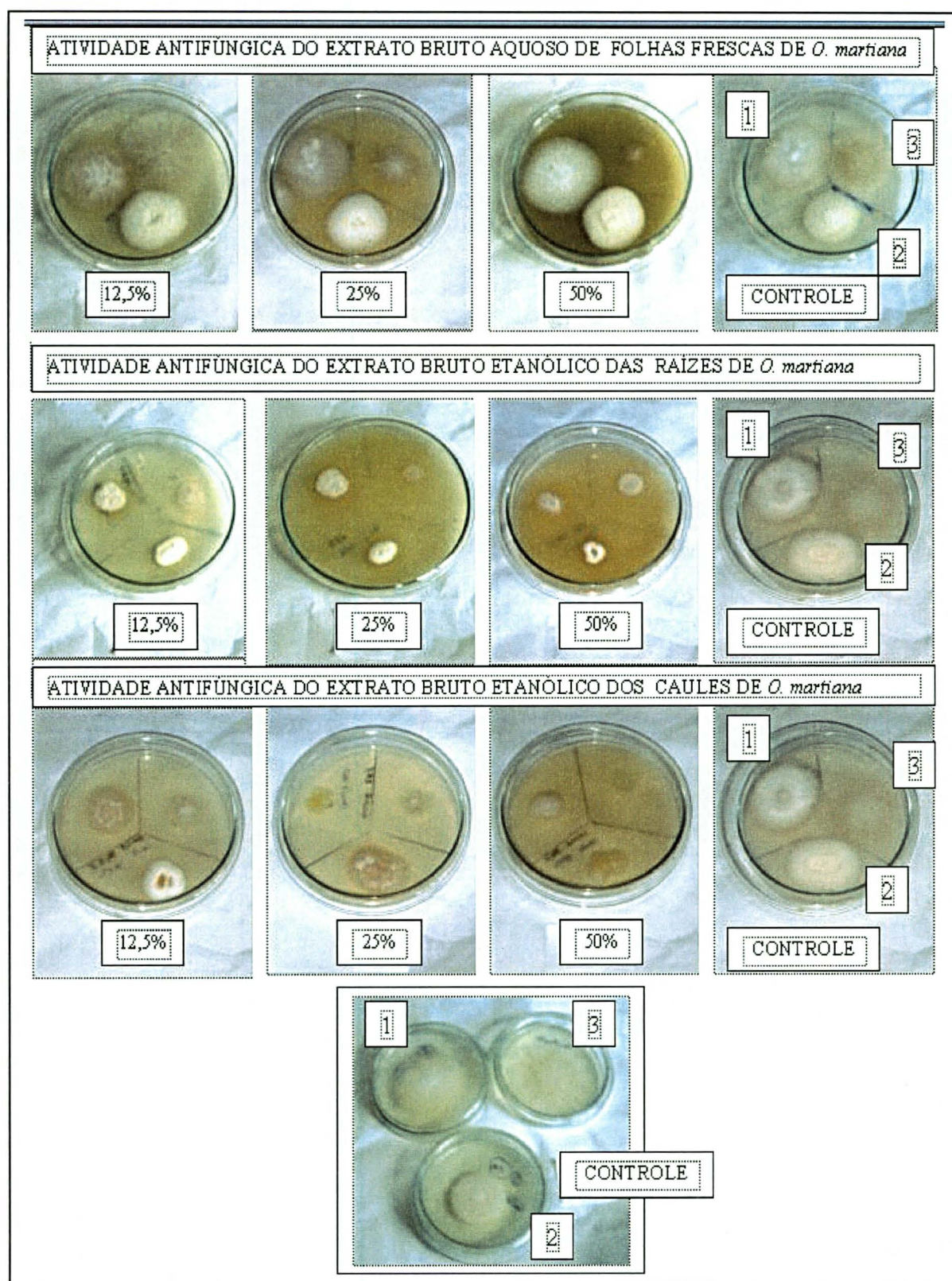


FIGURA 28 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DA *O. martiana*

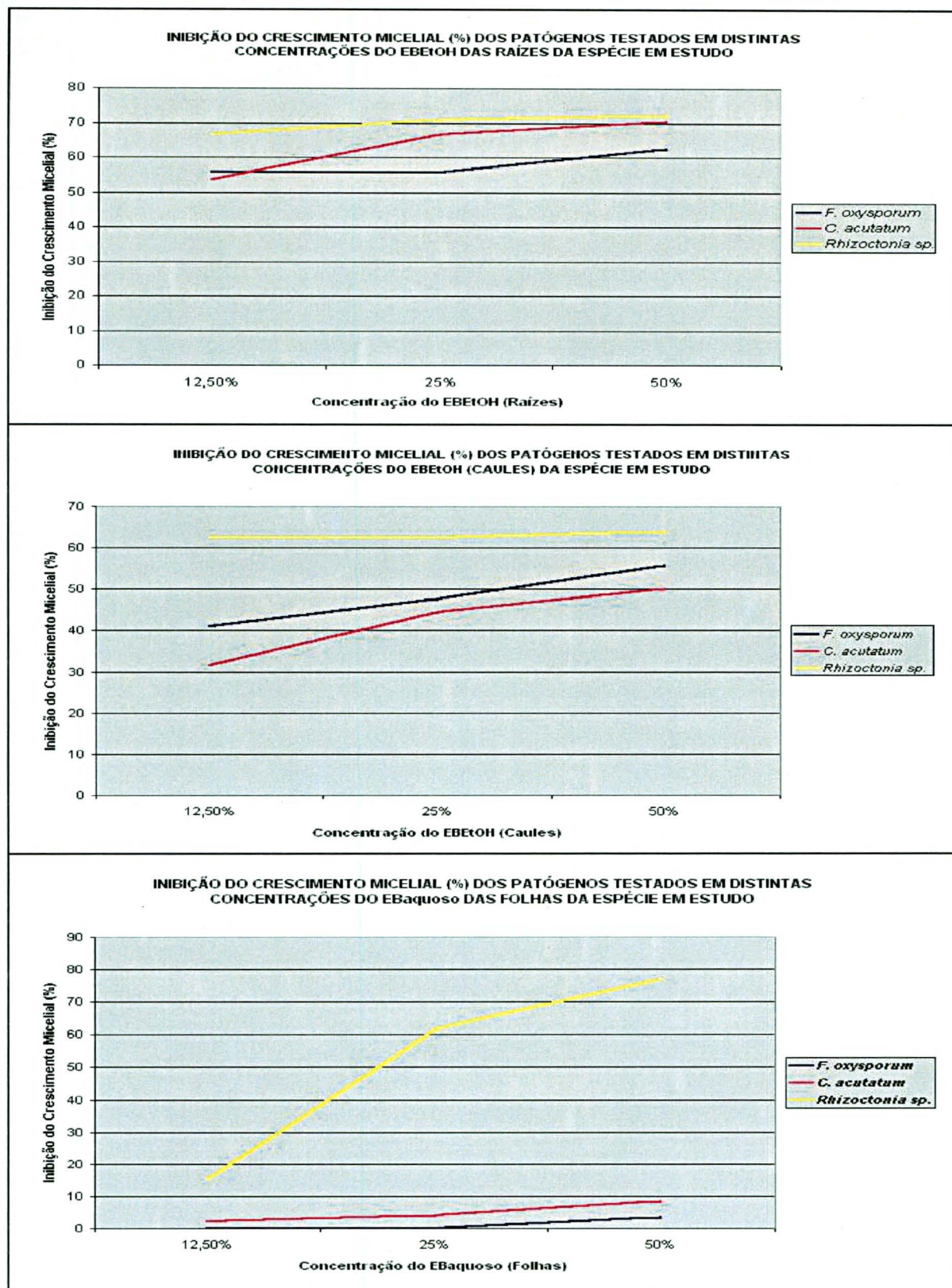
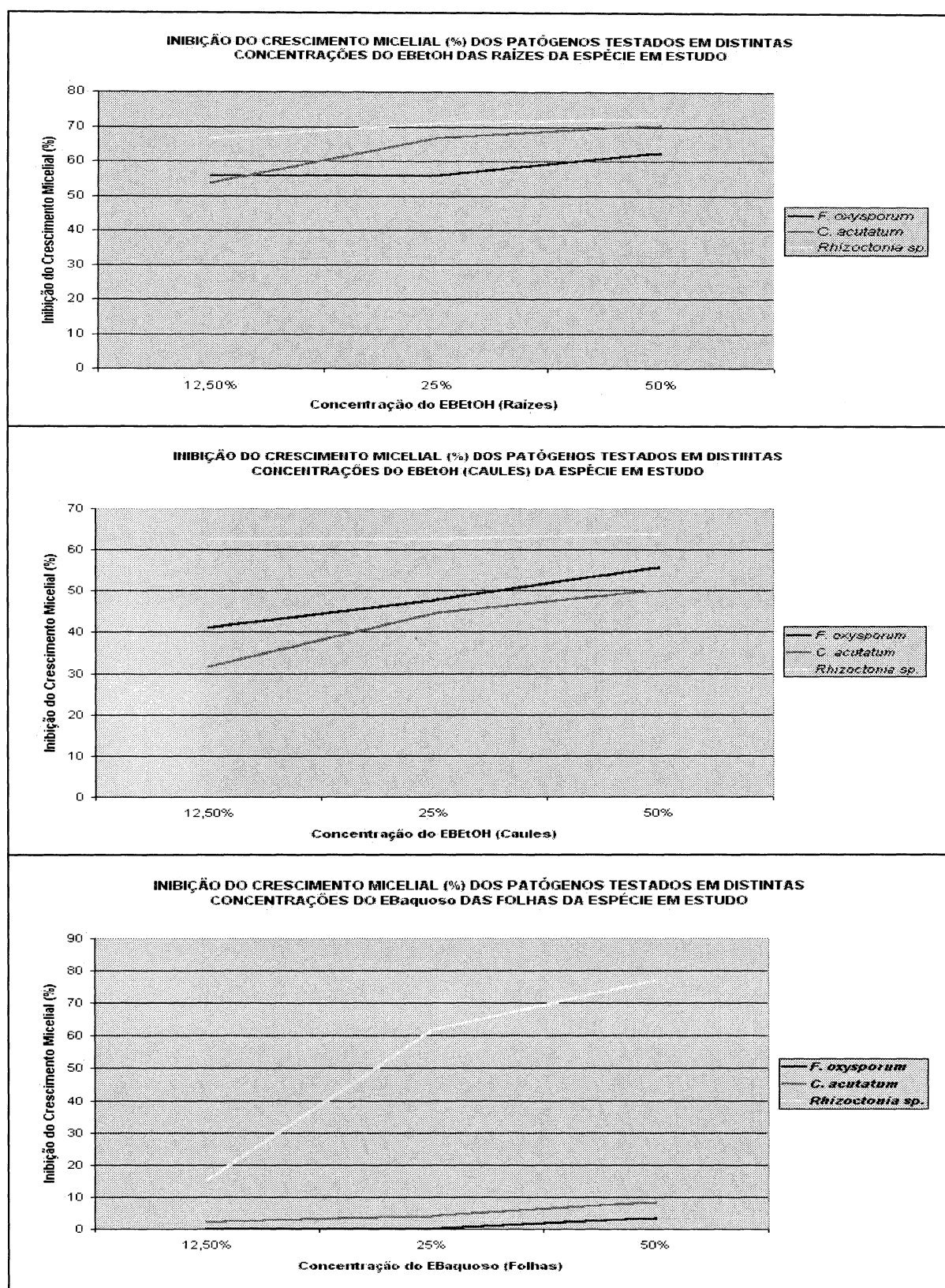


FIGURA 28 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DA *O. martiana*



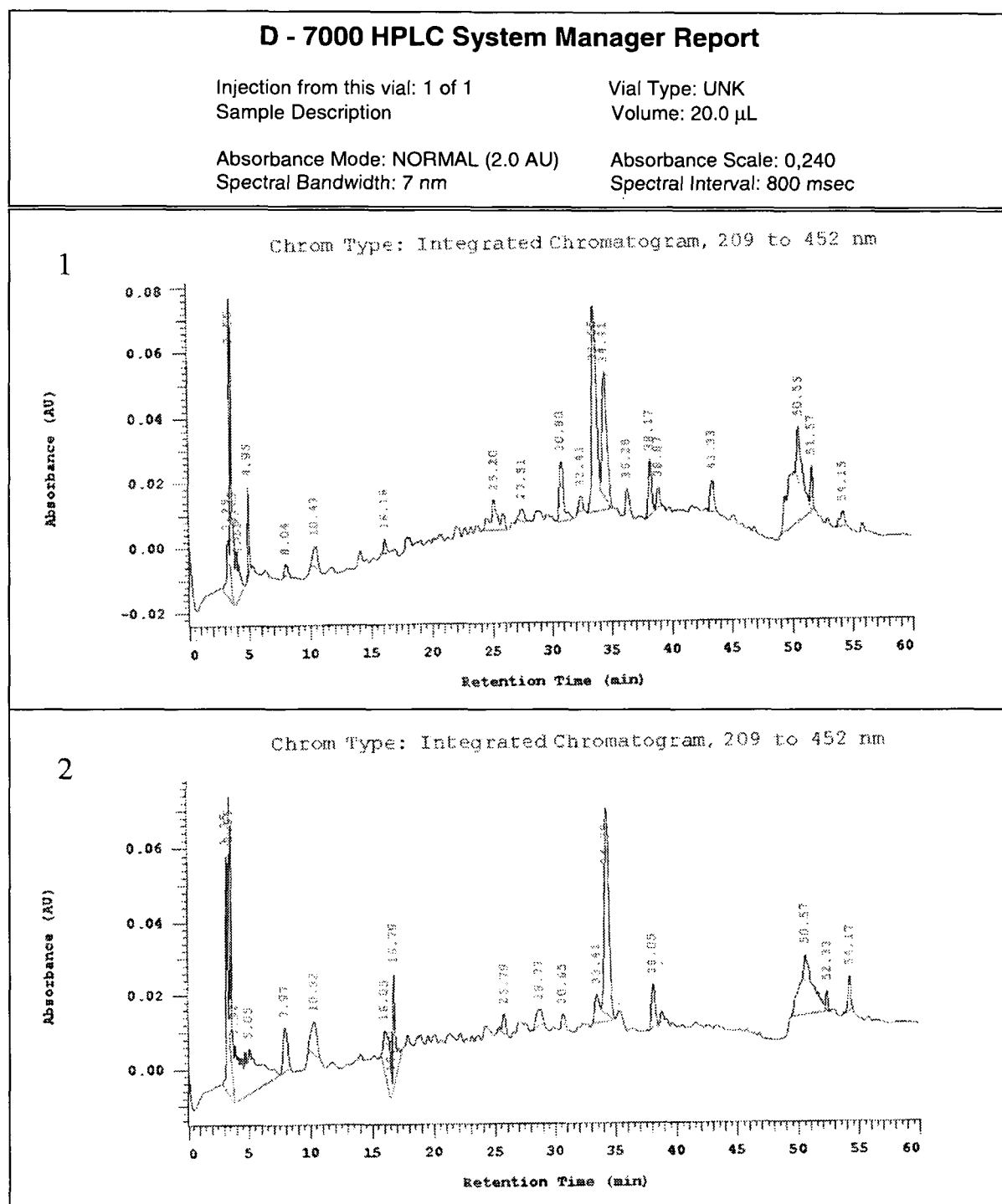
Estudo similar foi realizado com EBAquosos das plantas medicinais *Ocimum basilicum* (alfavaca), *Ruta graveolens* (arruda) e *Baccharis trimera* (carqueja), as quais apresentaram atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp. e *Colletotrichum graminicola* (STANGARLIN et al., 1999, p. 16-21).

Como a atividade fungitóxica dos extratos dependem do método de extração e da concentração do extrato no meio de cultura, novos ensaios foram realizados utilizando-se extrato bruto aquoso e extrato seco etanólico de folhas estabilizadas, os quais não inibiram o crescimento dos fungos testados.

O extrato bruto aquoso das folhas (material fresco), utilizado para o teste da atividade antifúngica sobre o crescimento micelial, foi monitorado antes de ser autoclavado e após ser autoclavado por meio de CCD e HPLC, ficando evidenciado uma possível hidrólise de compostos. Entretanto, quando estes foram comparados com amostras autênticas (Isopiperlonguminina e Piperovatina), não foram evidenciadas alterações com estas substâncias (figs. 29A e 29B).

FIGURA 29 A - PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPLC):

- 1 - EXTRATO BRUTO AQUOSO DAS FOLHAS (FRESCAS) NÃO AUTOCLAVADO
 2 - EXTRATO BRUTO AQUOSO DAS FOLHAS (FRESCAS) AUTOCLAVADO



Acquisition Method: Agrião clorogênic-flavonoíde

Column Type: RP 18 250-4

Developed by: João Luiz

Pump A Type: L-7100

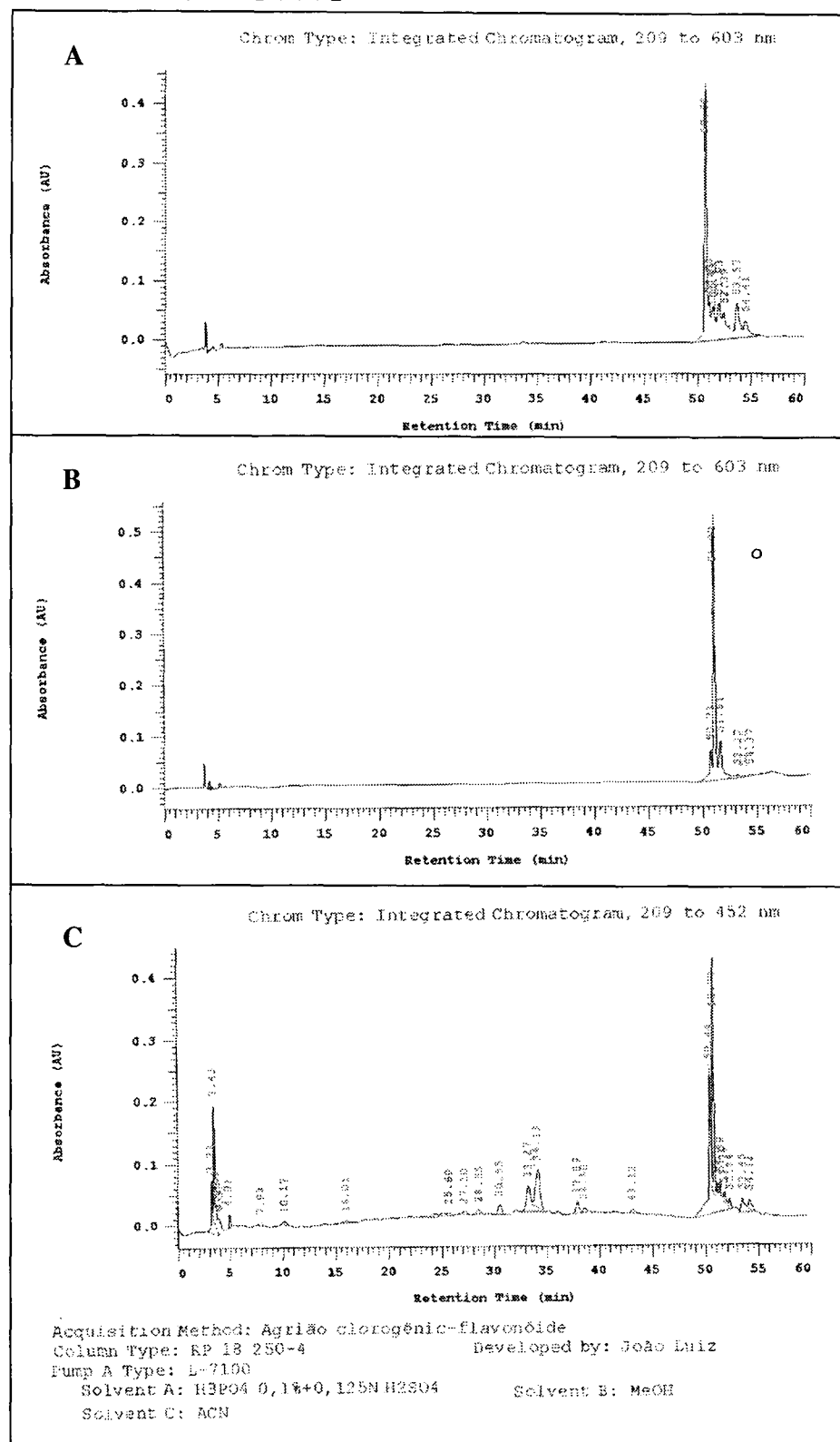
Solvent A: H₃PO₄ 0,1% + 0,12 N H₂SO₄ Solvent B: MeOH Solvent C: ACN

FIGURA 29 B - PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPLC):

A - PADRÃO: ISOPIPERLONGUMININA

B - PADRÃO: PIPEROVATINA

C - A + B + 1 + 2



No bioensaio por CCD (STANGARLIN et al., 1999) para a detecção de compostos fungitóxicos presentes no extrato bruto etanólico das folhas estabilizadas e nas frações do extrato dos frutos desta espécie em estudo: hexano (H), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M), não se visualizou a presença de frações que causassem a inibição dos patógenos testados, pelo fato das colônias destes fungos apresentarem coloração clara semelhante à coloração das placas cromatográficas preparadas com Sílica-gel. Por este motivo, realizou-se um exame microscópico destas placas para confirmar a presença de fungo e de zonas de inibição, cujos resultados encontram-se na tabela 12.

TABELA 12 - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA NAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS, PARA CONFIRMAR A OCORRÊNCIA DE ZONAS DE INIBIÇÃO DOS PATÓGENOS EM ESTUDO NAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *O. martiana*

Fungo	Resultado dentro da banda das frações: H - C - A - M	Resultado fora da banda das frações: H - C - A - M	Controle (Testemunha)
<i>C. spathulatum</i>	Produção de pouco micélio, sem esporos	Produção de micélio e escleródios	Produção de micélio sem esporos e sem microescleródios
<i>C. acutatum</i>	Produção de micélio e esporos	Menor produção de micélio e esporos	Produção de micélio e esporos (< em relação às placas com as frações do extrato)
<i>F. oxysporum</i>	Produção de micélio, esporos e clamidospores	Produção de micélio, esporos e clamidospores	Produção similar de micélio e esporos (< em relação às placas com as frações do extrato)

No ensaio fungitóxico por CCD os resultados não foram conclusivos, mas percebeu-se que não houve inibição significativa no crescimento das colônias dos fungos em estudo.

De um modo geral, dependendo do órgão utilizado da *O. martiana*, existe princípio ativo contra os fungos testados, mas a quantidade necessária para causar inibição do crescimento micelial precisa ser aparentemente alta.

5 CONCLUSÃO

Após estudos realizados com extratos de *O. martiana*, foram delineadas as seguintes conclusões:

- Dos constituintes químicos isolados das raízes de *O. martiana*, duas amidas das frações diclorometano (12 e 20): a Isopiperlonguminina e a Piperovatina foram identificadas por meio de Espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .
- Pela análise do extrato E1 dos frutos de *O. martiana*, por CCD, CG, CG-MS e comparação com amostras autênticas, evidenciou-se a presença de dois esteróides: isômeros dos compostos estigmasterol e β -sitosterol.
- Extratos Brutos Etanólicos de *O. martiana* (Raízes e Caules), nas concentrações de 50% e 100% (EBEtOH puro), apresentaram um efeito antibacteriano sobre *S. aureus*.
- Pelo método utilizado para avaliar a atividade antifúngica dos extratos de *O. martiana*, ficou evidente que extratos etanólicos das raízes inibem o crescimento micelial dos fungos testados nas concentrações de 12,5%, 25% e 50% em meio BDA, indicando que a atividade antifúngica dos extratos testados depende da concentração, do órgão vegetal e do método de extração utilizado.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho compõem a 1ª fase desta pesquisa, uma vez que a continuidade da mesma, pela busca em obter-se maiores rendimentos para a identificação das demais substâncias isoladas, já encontra-se em andamento.

Sendo assim, esta pesquisa reafirma a necessidade de se investir na busca de novos fármacos com atividades farmacológicas comprovadas, por meio de isolamento, identificação, determinação e modificação estrutural de substâncias orgânicas presentes nas plantas, estudando-se formas adequadas de obtenção de derivados dos compostos previamente isolados e identificados, no sentido de se obter substâncias puras com maior atividade farmacológica e menor toxicidade, além da realização de novos testes biológicos para reforçar a possível utilização de extratos brutos vegetais como um método alternativo no controle de doenças de plantas.

Nesta ótica, remete-se à grande aplicabilidade desta busca, quando pretende-se tratar o cultivo de frutas, as quais são consumidas geralmente “*in natura*”. Aliado tem-se a grande perspectiva de aplicação destes ativos nas áreas de cultivo de plantas medicinais, uma vez que a Legislação Brasileira não prevê a liberação para uso de produtos fitossanitários com finalidade de controle de doenças, insetos e plantas daninhas.

REFERÊNCIAS

ATAL, C. K.; DHAR, K. L.; SINCH, J. The chemistry of Indian *Piper* species. **Lloydia**, Cincinnati, v.38, n.3, p. 257-265, 1975.

AUER, C. G.; BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF**. Piracicaba, n. 32, p. 49-51, abril, 1986.

BARROSO, G. M., *et al.* **Sistemática de Angiospermae do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v.1, 1978. 255 p.

BRAZ FILHO, R. Química de Produtos Naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Química Nova**. São Paulo, v.17, n. 5, p. 405-420, 1994.

COSTA, S. S.; MORS, W. B. Amide of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, Kidlington-Oxford, v.20, n.6, p. 1305-1307, 1981.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1260 p.

DUNSTAN, W. R.; GARNETT, H. The constituents of *Piper ovatum*. **Journal of the Chemical Society**, London, v.67, p. 94-103, 1895.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. 12 auf. Berlin Borntraeger, v.2, 1964.

GIESBRECHT, A. M.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. R. (2E,4E)-N-isobutyl-9-piperonyl-nona-2,4-dienoic amide from *Ottonia anisum*. **Planta Médica**, Stuttgart, v.43, p. 375-377, 1981.

GOTTLIEB, O. ; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**. São Paulo, v. 15, n.89, p. 51-54, abr., 1993.

GUEDES, A. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Analgésica e Antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex. Miq. (Chloranthaceae)**. Florianópolis, 1997. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal de Santa Catarina.

GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. F. L.; COSTA, C. G. Piperaceae. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1978. 27 p.

HÄNSEL, R.; LEUSCHKE, A.; BOHLMANN, F. New isobutylamide from *Ottonia ovata*. **Planta Médica**, Stuttgart, v.40, p. 161-163 (oct), 1980.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12^a ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. v. 4, 1998. 777 p.

JORQUEIRA, C. S. Utilizacion industrial de plantas medicinales. **Workshop presented in UNIDO in Latin America**. Panajachel, Guatemala, p. 11-17, july, 1993.

KUZE RATES, S. M.; CHAVES, C. G.; VON POSSER, G. L. Investigation of local anesthetic effect and toxicity of *Ottonia propinqua* (Piperaceae) **Acta Farmaceutica Bonaerense**, La Plata, v.16, p. 113-116, apr.-jun., 1997.

LOPES, M. **Contribuição para o Estudo Fitoquímico de *Ottonia martiana* Miq. – Piperaceae**. Curitiba, 1989. 102 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAKAPUGAY, H. C.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A . D.; BORDAS, E. Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutescens*. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon-Ireland, v.7, p. 235-238, mar. 1983.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. EMBRAPA - CNPTrigo, Brasília, v.1, p. 369-409, 1993.

MCFERREN, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorium*. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon-Ireland, v.60, p. 183-187, 1998.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1950. p.1021-1123.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo : Editorial Robe, 1999. 115 p.

MIGUEL, O. G. **Estudo Químico e Farmacológico das Espécies *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus fraternus* e *Siphocampylus verticillatus***. Florianópolis, 1996. 219 f. Tese (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal de Santa Catarina.

MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M.; GUIMARÃES, 1-Butil-3,4-metihylenedioxybenzene as the major constituent of essential oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Research**. Stream-Ilinóis, v.9, n.5, p. 565-568, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. p. 26-27.

OLIVEIRA, J. S. **Avaliação do Emprego de Gases Liqüefeitos no Estado Subcrítico como Solventes para Extração de Produtos Naturais**. Curitiba, 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Departamento de Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA, J. S. Extrator para operação com gases liquefeitos. PI 9804199-1, 16-10-1998.

PINDER, A. R.; PRICE, S. J. The chemistry of *Ottonia vahlii* Kth: the volatile constituent. Part. I. Section C. **Journal of the Chemical Society**. London, (C), p. 2598-2599, 1967.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 279 p. : il.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**. Milão, v. 63, n.3, p. 147-166, 1987.

SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon-Ireland, v.45, p. 177-181, 1995a.

STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., SILVA CRUZ, M. E.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, ano II, n. 11, p. 16-21, nov./dez., 1999.

SCHWARTSMANN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. **Caderno S Saúde Pública**, v.10, n. 1, p. 126-131, jan./mar., 1994.

ULUBELEN, A.; ÖKSÜZ, S.; BOZOK-JOHANSSON, C.; CELIK, C.; VOELTER, W. Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia viridis*. **Planta Médica**. Stuttgart, v. 66, n. 5, p. 458-462, june, 2000.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. **SANEST**. Pelotas, RS. UFPEL, 1984. 2 disquetes; 3^{1/2} pol. Programa Estatístico para Microcomputadores.

Vascular Plant Image Gallery. Disponível em: www.csdl.tamu.edu/FLORA/mi15/mi15044.jpg Acesso em: 10 abr. 2000.

OmniCyber. Disponível em: www.omnicyber.org/Bio/HTML/P/Piperaceae.html Acesso em: 10 abr. 2000.

YUNCKER, T. C. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea**. São Paulo, v.3, p. 121-3, 136-8, 1973.